

D3



PCT
WELTORGANISATION
Internat.
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖF
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT

WO 9603996A1

<p>(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : A61K 33/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/03996</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Februar 1996 (15.02.96)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03100</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. August 1995 (03.08.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 44 27 690.7 4. August 1994 (04.08.94) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: BOGDAHN, Ulrich [DE/DE]; Mittlere Herbergstrasse 25c, D-97078 Würzburg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAUER, Albrecht [DE/DE]; Kreilshausenerstrasse 9, D-74575 Schrozberg (DE). HAASE, Axel [DE/DE]; Frankenstrasse 21a, D-97222 Rimpar (DE).</p> <p>(74) Anwalt: RUCKER, Ernst; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: DEUTERIUM-CONTAINING PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR DESTROYING TUMORS</p> <p>(54) Bezeichnung: DEUTERIUM ENTHALTENDE PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ZUR ABTÖTUNG VON TU- MOREN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention pertains to the use of a pharmaceutical composition containing deuterium and/or deuterated substances and/or substances that enrich or release deuterium to selectively destroy tumor cells and/or tumor metastases or to prevent metastasizing and/or local recurrence of tumors as well as their regrowth.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltend Deuterium und/oder deuterierte Substanzen und/oder Substanzen, die Deuterium anreichern bzw. freisetzen, zur selektiven Abtötung von Tumorzellen und/oder Tumormetastasen bzw. zur Verhinderung der Metastasierung und/oder des lokalen Wiederauftretens von Tumoren sowie deren Nachwachsen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

combinatoric

DEUTERIUM ENTHALTENDE PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR ABTOETUNG
VON TUMOREN

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammen-
setzung enthaltend Deuterium und/oder deuterierte Substanzen und/oder
Substanzen, die Deuterium anreichern bzw. freisetzen, zur selektiven Abtötung
von Tumorzellen und/oder Tumormetastasen bzw. zur Verhinderung der Me-
5 tastasierung und/oder des lokalen Wiederauftretens von Tumoren sowie deren
Nachwachsen.

Die bisher entwickelten Tumortheraeutika und Zytostatika leiden alle an dem
Nachteil, daß sie nicht ausreichend selektiv zwischen Tumorzelle und gesunder
10 Zelle unterscheiden. Die bisher entwickelten Tumortheraeutika und Zyto-
statika leiden zudem an dem Nachteil, daß sie gegen Hirntumoren, dort ins-
besondere Glioblastome, sowie gegen Melanome nur ungenügend wirksam
sind, und eine Tumorprogression nur ungenügend verlangsamen. Dies zeigen
insbesondere die mittleren Überlebenszeiten bei Glioblastom- und Melanom-
15 Patienten von unter einem Jahr. Ebenso sind Tumortheraeutika gegen Bron-
chialkarzinome und Karzinome des Magen-Darm-Traktes nur ungenügend
wirksam.

Bisherige Tumortheraeutika leiden zudem unter dem Nachteil, bereits in
20 geringsten Konzentrationen hohe Nebenwirkungen, insbesondere Immunsup-
pression und Blutbildveränderungen und Knochenmarksdepression sowie
Induktion von neuen Tumoren zu verursachen.

- 2 -

- durchzuführen. Diese blieben jedoch bisher erfolglos bzw. führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. So berichtet z.B. Barbour (Barbour, H. und Allen, E. Tumor growth one fifth saturated with deuterium oxide (heavy water), Am. J. Cancer 32, 1938) über das langsamere Wachstum der implantierten Tumoren, kommt jedoch zu dem Schluß, daß die Überlebensspanne der tumortragenden Tiere durch D₂O Anwendung dosisabhängig verkürzt wurde, daß also keine erfolgreiche Behandlung möglich ist. Insbesondere hohe D₂O Konzentrationen werden stets als toxisch eingestuft.
- 10 Neueste Literatur zum Thema D₂O und Tumor belegen, daß der Entzug von D₂O das Tumorwachstum im Mausmodell inhibiert (Somlyai, G., Jansco, G., Jakli, G., et al.: Naturally occuring deuterium is essential for the normal growth rate of cells, FEBS 317, 1-4 (1993)), und das Vorhandensein von D₂O notwendige Voraussetzung für das Tumorwachstum ist.
- 15 Bisherige Untersuchungen zu D₂O zeigten also, daß D₂O als Tumortherapeutikum nur wenig geeignet erschien.
- 20 Explizit wird in der Literatur auch mehrfach auf die Reversibilität der Deuteriumeffekte hingewiesen (Gross, P.R. et al., Mitotic Arrest by Deuterium Oxide, Science 131, 37-39, 1960).
- 25 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine selektive und zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen und/oder Metastasen auszuüben und das Wachstum normaler Zellen weitgehend unbeeinflußt zu lassen sowie die Metastasierung und/oder das Wiederauftreten von Tumoren und/oder deren Nachwachsen zu verhindern. Dadurch würden auch einige der bei Tumortherapeutika bekannten Nebenwirkungen vermieden.
- 30 Gelöst wird diese Aufgabe durch die Verwendung einer pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Patentanspruch 1,2,9 oder 10 d.h. durch die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltend Deuterium

chern bzw. freisetzen. Bevorzugte Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Systematische Untersuchungen zum Einsatz von Deuterium-enthaltenden Substanzen als Therapeutikum gegen Tumoren wurden bisher nicht durchgeführt, unklar war bisher insbesondere, ob Unterschiede in der Beeinflussung des Wachstums von Tumorzellen und normalen Zellen bestehen.

Daher wurden von dem Anmelder systematische Studien über das Verhalten von Tumorzellen unter Deuteriumeinfluß durchgeführt.

Überraschenderweise wurde dabei eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen festgestellt. Zudem wurde überraschend festgestellt, daß die direkte zytotoxische Wirkung von Deuterium stark selektiv auf Tumorzellen ist, d.h. daß diese in wesentlich stärkerem Maße abgetötet werden als vergleichbare Normalzellpopulationen. Überraschenderweise wurde zudem festgestellt, daß die bekannten Effekte der Zellzyklusarretierung und der Wachstumshemmung ebenfalls in hohem Maße selektiv für Tumorzellen sind, d.h. daß Zellzyklusarretierung und Wachstumshemmung auf Tumorzellen sehr viel stärker ausgeprägt ist als auf Normalzellen und somit eine selektive Wirkung auf Tumorzellen vorliegt.

Die direkte zytotoxische Wirkung kann *in vitro* an Zellkulturmaterial nachgewiesen werden. Dabei werden Zellen *in vitro* durch Zusatz einer Deuterium-enthaltenden Substanz bzw. Verbindung zum Kulturmedium abgetötet. Die nachfolgenden Vol.-% Angaben sind wie folgt zu verstehen. 100 Vol.-% Deuterium enthaltende Substanz bedeutet, daß dort alle H-Atome an einer (oder mehreren) bestimmten Stellen durch D-Atome ersetzt sind. Beispielsweise enthält reines D₂O, Molgewicht 20.03 g/mol, 2 Atome Deuterium (4g/mol) und ein Atom Sauerstoff (16 g/mol). Wird daher die Konzentration einer "Deuterium enthaltenden Substanz" festgelegt, beträgt ihr Gehalt an reinem Deuterium in diesem Beispielsfall nur maximal 20 Gew.-%, entspre-

Eine geeignete Konzentration zur Abtötung von über 95% Zellen, z.B. des Tumors HTZ-19 (malignes Melanom), unter geeigneten Kulturbedingungen als Monolayer ist über 50 Vol-% D₂O bzw. 99,86 g Deuterium pro kg Wirksubstanz oder eine andere Deuterium-enthaltende Substanz mit an einer bestimmten Stelle durch D ersetzten H-Atomen in 50 % Volumenanteil, vorzugsweise
5 über 70 Vol-% (139,81 g Deuterium/kg), ganz bevorzugt über 90 Vol-% (179,75 g Deuterium/kg). Höhere oder geringere Konzentrationen sind jedoch ebenfalls zur Abtötung von Tumorzellen in höherem bzw. geringerem Umfang geeignet.

10

Bei einer Konzentration von ca. 10 Vol.-% (19,97 g Deuterium/kg) D₂O oder Deuterium-enthaltender Substanz wurden bei Normalgliazellen HTZ-140 im gleichen Zeitraum nur 5% Wachstumshemmung, aber keine Zellabtötung, beobachtet.

15

Es hat sich gezeigt, daß Deuterium auf Tumorzellen eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen durch Hemmung der DNA-Synthese [³H-Thymidin-Einbau, Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H. Shevach, E.M., Strober, W., Current Protocols Immunology, NIH Monographie, J. Wiley & Sons, New York,
20 1992], sowie nachgewiesen durch Zellmembrandefekt [Trypanblau-Färbung, G.K. Smith, Duch, D.S., Dev, I.K. Kaufmann, S.H., Metabolic Effects and Kill of Human T-Cell Leukemia by 5-Deaza acyclotetrahydrofolate, a Specific Inhibitor of Glycineamide Ribonucleotide Transformylase, Cancer Res. 52, 4895-4903, (1992)] hat. Das Überleben von normalen, nicht entarteten Zellen
25 wird dagegen nur in geringerem Umfang beeinflußt. Daher eignen sich Deuterium-enthaltende Substanzen zur Herstellung eines Therapeutikums zur Abtötung von Tumorzellen und/oder Metastasen sowie zur Verhinderung von Metastasen und/oder des lokalen Wiederauftretens von Tumoren und deren Nachwachsen. Insbesondere ist ein solches Therapeutikum zur Therapie von
30 malignen Melanomen, Gliomen und Astrozytomen, Bronchialkarzinomen (insbesondere kleinzellige Bronchialkarzinome), Neuroblastomen, sowie Karzinomen des Magen-Darm-Traktes geeignet.

Für die therapeutische Anwendung werden Deuterium oder deuteriumhaltige bzw. deuteriumfreisetzende oder deuteriumanreichernde Substanzen üblicherweise mit Hilfs-, Füll- und/oder Zusatzstoffen (z.B. Geschmacksstoffe, Elektrolyte, Nährstoffe, Vitamine, resorptionsbeeinflussende Substanzen) zusammen in einer, vorzugsweise sterilen, isotonen und/oder pyrogenfreien, pharmazeutischen Zubereitung bzw. Formulierung verwendet, vorzugsweise in Form von Zäpfchen, Salben, Lösungen, Dispersionen und Emulsionen, Aerosolen, Schäumen, teilchenförmigen Mitteln (z.B. Granulaten, Agglomeraten, Puder, Mikroperlen und Adsorbaten), Pillen, Pastillen, Tabletten, Dragees, Kapseln bzw. Mikrokapselformen, Kaugummiarten, Gewebe-, Blatt- oder Faden-
grundlagen, mit Bandagen oder Verbänden, zum Rauchen oder Inhalieren sowie in Carriern, wie z.B. Liposomen.

Die Verabreichung erfolgt zur Therapie vorzugsweise lokal, intracutan oder transcutan; zur systemischen Anwendung vorzugsweise intravenös, durch teilweisen Austausch des Körperwasser- oder Blutwasseranteils (z.B. per Dialyse), intraarteriell, oral, rectal; zur Anwendung in Hohlräumen vorzugsweise intrapleural, intrathekal, intraventriculär, intraperitoneal, intracavitär, in OP-Höhlen. Die Anwendung in OP-Höhlen dient vorzugsweise zur Rezidivprophylaxe des entfernten Tumors, d.h. zur Verhinderung des lokalen Wiederauftretens und Nachwachsens des Tumors. Möglich ist auch die extrakorporale Abtötung von Tumorzellen (z.B. "purgung" bei Knochenmarksneoplasien).

Für therapeutische Anwendungen werden Deuterium oder deuteriumhaltige bzw. deuteriumfreisetzende oder deuteriumanreichernde Substanzen auch mit anderen Wirkstoffen kombiniert, vorzugsweise anderen Zytostatika oder Tumorthérapeutika. Durch den neuentdeckten Effekt der Zellabtötung sowie die Tumorspezifität können additive bzw. überadditive (synergistische) Wirkungen in Kombination mit anderen Zytostatika und Tumorthérapeutika erreicht werden. Dies geschieht vorzugsweise durch Angriff auf das Zytoskelett, insbesondere durch Angriff am Tubulin. Insbesondere ist von einer Kombination mit erfindungsgemäßen deuteriumhaltigen Therapeutika eine Reduktion der

demzufolge auch eine Minderung der oft Therapie-einschränkenden Nebenwirkungen.

- Insbesondere ist eine Kombination mit Zytostatika/Tumortheraeutika erfolgversprechend, die auf gleichen oder ähnlichen Wirkprinzipien wie Deuterium
5 beruhen, nämlich Zellabtötung (auch Apoptose).

Beispiele für mögliche Kombinationspartner sind daher:

- 10 - Zelltodauslösende Substanzen: wie z.B. Adriamycin, Cisplatin, Cyclosporin A, Vinca-Alkaloide
- Inhibierende Wachstumsfaktoren, die Zelltod auslösen können: wie z.B. TGF- β (Tumor growth factor β), TNF (Tumor necrosis factor)
- 15 - Substanzen, die am Tubulin-Zytoskelett angreifen, wie z.B. Vinca-Alkaloide, Taxol, Taxol-Derivate sowie Colchicin und Colchicin-Derivate
- Alkylantien: wie z.B. Cyclophosphamid, Busulfan, ACNU und andere
20 Nitroseharnstoffderivate
- Purin und Pyrimidin-Antagonisten wie z.B. Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Cytarabin
- 25 Therapieeinschränkend ist bei vielen Zytostatika/Tumortheraeutika die hämatotoxische/immunsuppressive (Neben-)Wirkung (Verminderung der Blutzellzahlen/insbesondere Lymphozyten, sowie Knochenmarksdepression). Eine solche Wirkung ist von Deuterium bzw. Deuteriumhaltigen oder anreichernden Substanzen für Normalzellen, wie für Normalhirnzellen und insbesondere
- 30 Lymphozyten (Beispiel 6) gezeigt, nicht zu erwarten, d.h. Tumorzellen werden selektiv abgetötet. Aus diesem Grund ist auch die Behandlung von tumorös infiltriertem Knochenmark bzw. Knochenmarksstammzellen vor Knochenmark-

möglich, wobei dies intrakorporal als auch extrakorporal geschehen kann. Eine gleiche Wirkung kann daher durch Kombination solcher Tumorthérapeutika mit Deuterium bzw. deuteriumhaltigen und freisetzenden Substanzen bei geringerer Dosis erzielt werden. Bei gleicher Dosis kann durch die Kombination mit
5 Deuterium ein größerer Antitumor-Effekt als bisher möglich erreicht werden.

Deuterierte Tumorthérapeutika sind daher insbesondere geeignet zur Kombination mit

- 10 - Antimetaboliten: wie z.B. Methotrexat, Thioguanin
- Alkaloide: wie z.B. Vinblastin, Vincristin, Taxol
- Antibiotika mit Tumor-therapeutischer Potenz: wie z.B. Daunorubicin,
15 Bleomycin, Epirubicin
- verschiedenen anderen Knochenmarks-depressiv wirkenden Tumorthérapeutika, wie z.B. Hydroxyharnstoff, Procarbazin sowie Alkylantien, und Purin/Pyrimidinderivate.

20

Eine synergistische oder potenzierende Wirkung ergibt sich auch bei Einsatz der pharmazeutischen Zusammensetzung in Kombination mit Bestrahlungsmethoden, wie Gammastrahlung, Elektronenstrahlung (β -Strahlung), Neutronen und Korpuskularstrahlung.

25

Die Zellproliferation wurde mittels ^3H -Thymidin-Einbau, wie z.B. in "Bogdahn, U., R. Apfel, M. Hahn, M. Gorch, C. Bohl, J. Hoppe und R. Martin: Autocrine tumor cell growth inhibiting activities from Human Malignant Melanoma, Cancer Res. 49, 5358-5363 (1989)" dargestellt, gemessen. Wachstums- und
30 Überlebenskurven liegen Zellzählung mit Trypanblau-Farbstoff zugrunde.

Vorzugsweise werden solide Tumore, wie z.B. Glioblastoma multiforme, Astro-

Sarkome, Mammakarzinome, Zervixkarzinome, Uteruskarzinome, Prostatakarzinome, Schilddrüsenkarzinome, Pankreaskarzinome sowie Malignome des hämatopoetischen und lymphopoetischen Systems, durch die erfindungsgemäße Zusammensetzung therapiert.

5

Als Kontrolle für Normalzellen können Zellen aus Normalhirn (nach Schädel-Hirn-Trauma), Normalhirn oder IL-2 stimulierte (frisch isolierte) Lymphozyten, PHA stimulierte (frisch isolierte) Lymphozyten verwendet werden.

- 10 Die Wirkung von Deuterium auf Zellen wird vorzugsweise mit D_2O erreicht. Die Herstellung des geeignet konzentrierten D_2O erfolgte im Experiment vorzugsweise durch Verdünnen von hochreinem D_2O ($> 99\%$) mit H_2O . Zur Therapie bestimmtes D_2O wird vorzugsweise direkt in der gewünschten Konzentration hergestellt. Die erfindungsgemäße Wirkung von Deuterium kann aber auch
- 15 durch andere, Deuterium enthaltende oder Deuterium in geeigneter Weise freisetzende oder anreichernde Substanzen erzielt werden. Darunter sind alle denkbaren anorganischen oder organischen Verbindungen, die Deuterium enthalten, zu verstehen, z. B. insbesondere deuterierte Aminosäuren (wie z.B. deuteriertes Glutamin, deuteriertes Alanin und deuteriertes Glutamat), deuterierte
- 20 Zucker (wie z.B. deuterierte Glucose, deuterierte Fructose), deuterierte Fette, deuterierte DNA- oder RNA-Bausteine (z.B. deuteriertes Adenin, Guanin, Cytosin, Thymidin, Uracil) sowie deuterierte Stoffwechselprodukte (z.B. deuteriertes Pyruvat, deuteriertes Lactat) sowie deuterierte Stoffwechselprodukte des Intermediärstoffwechsels.

25

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß durch Anwendung von D_2O und anderen deuterierten Verbindungen überraschenderweise eine erfolgreiche Therapie von Tumoren und Metastasen möglich ist. Eine Metastasierung wird vollständig verhindert.

30

Neben einer Wachstumsverlangsamung wird überraschenderweise auch eine irreversible Zerstörung von Tumoren bzw. Tumorzellen durch den Effekt des "cell-kill" beobachtet. Der Effekt der Zelltötung ist dabei tumorspezifisch, eine

Abtötung von gesunden Zellen wird nur in einem nicht relevanten Umfang beobachtet.

Entgegen früher Annahmen weist D₂O in einer therapeutisch wirksamen Dosis, d.h. in einer Dosis bei der eine Abtötung von Tumorzellen beobachtet wird, eine ausreichende Verträglichkeit auf, so daß eine Anwendung über längere Behandlungszeiträume bis zur vollständigen Heilung möglich ist.

Die Erfindung wird nun weiter durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den anhängenden Abbildungen erläutert. Die Abbildungen zeigen:

- Abb. 1, 2, 9, 13, 14, 19, 23: ³H-Thymidin-Einbau in Relation zur Deuterium-Konzentration,
- Abb. 3, 4, 10, 15, 16, 20, 24: Wachstumskurven von Tumorzellen und Kontrollen,
- Abb. 5, 6, 11, 17, 21, 25: Überlebensrate von Tumorzellen in Relation zur Aufenthaltsdauer in Deuterium-enthaltenden Medien,
- Abb. 7, 8, 12, 18, 22, 26: Überlebensfraktion von Tumorzellen in Relation zur Aufenthaltsdauer in Deuterium-enthaltenden Medien
- Abb. 27a + b: Zellzyklus von unbehandelten HTZ-19-Melanomzellen
- Abb. 28a + b: Zellzyklus von HTZ-19-Melanomzellen nach 3 Tagen in 50 Vol-% D₂O
- Abb. 29a + b: Zellzyklus von HTZ-19-Melanomzellen nach 3

- Abb. 30: Koloniebildungsrate in Soft Agar
- Abb. 31: Migrationsfläche eines Tumors
- 5 Abb. 32: Vergleich der Anzahl von Lebermetastasen bei unbehandelten Versuchstieren und mit D₂O-behandelten Versuchstieren nach Implantation eines Sarkoms M 5076
- 10 Abb. 33: Vergleich der Anzahl überlebender Versuchstiere nach intraperitonealer Implantation eines Sarkoms M 5076
- 15 Beispiel 1:

Bestimmung der Wirkung von Deuterium auf Tumorzellen

Zur Bestimmung der Wirkung von Deuterium auf Tumorzellen werden exponen-

20 tiell wachsende HTZ-209B, HTZ 243, HTZ 19, HTB 69, HTZ 25, CaCo-2 oder HT 29 Zellen für jeweils mindestens 24 Stunden in Mikrokulturplatten mit 96 Vertiefungen (wells) (Costar, Zürich) in 200 µl Kulturmedium mit einer Dichte von 3000 Zellen pro well ausgesät [nach Chambard et al. J. Cell. Physiol. 135 (1988), 101-107]. Das Kulturmedium besteht aus Dulbeccos MEM mit 10%

25 FCS-Zusatz, 1% Vitaminen, 1% nichtessentielle Aminosäuren sowie 0,3% L-Glutamin.

Danach wird ein Mediumwechsel durchgeführt und deuteriertes Medium zugesetzt. Deuterierte Medien werden unter Verwendung von MEM-Pulver-

30 medium und hitzesterilisiertem D₂O sowie Ultra Pure Water zur Verdünnung mit identischen Zusätzen, wie konventionelles Kulturmedium, hergestellt.

- für einen definierten Zeitraum bei 37°C, 5% CO₂, inkubiert. Nach Zugabe von 1 µCi ³H-Thymidin (spez. Aktivität 23 Ci/mol, Amersham Buchler, Braunschweig) pro well werden die Zellen 16 Stunden weiter inkubiert und anschließend wird der ³H-Thymidin-Einbau in die zelluläre DNA nach Säurefällung in üblicher Weise mittels Flüssigszintillationszähler gemessen. Die Wirkung von Deuterium wird als Prozentsatz des ³H-Thymidin-Einbaus der behandelten Zellen gegenüber dem ³H-Thymidin-Einbau in unbehandelten Kontrollzellen ausgedrückt.
- 10 Unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von D₂O kann eine Konzentration ermittelt werden, bei welcher der ³H-Thymidin-Einbau um 50% gegenüber der unbehandelten Kontrolle gehemmt wird. (IC 50 Wert).

15

20

Tumor		IC 50 [Vol-% D ₂ O]
HTZ 209	Glioblastoma multiforme	41
HTZ 243	Astrozytom, WHO III	9
HTZ 19	malignes Melanom	49
HTB 69	malignes Melanom	71
HTZ 25	Bronchialkarzinom	39
CaCo-2	Colonkarzinom	45
HT 29	Colonkarzinom	42

25 Beispiel 2:

Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Deuterium auf Tumorzellen

Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Deuterium auf Tumorzellen

243, HTB 69, HTZ 25, CaCo-2 oder HT 29 Zellen für mindestens 24 Stunden in Mikrokulturplatten mit 96 Vertiefungen (wells) oder in Mikrokulturplatten mit 24 Vertiefungen mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro well ausgesät. Das Kulturmedium besteht analog Beispiel 1 aus Dulbeccos MEM mit 10% FCS Zusatz, 1% Vitaminen, 1% nichtessentiellen Aminosäuren sowie 0,3% L-Glutamin. Danach wird ein Mediumwechsel durchgeführt und deuteriertes Medium in gewünschter Konzentration zugesetzt. Die Zellen werden in deuteriertem Medium in der gewünschten Konzentration für einen definierten Zeitraum bei 37°C, 5% CO₂, inkubiert. Danach werden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einem definierten Volumen mit Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%, Sigma Chemicals St. Louis) versetzt. Die Zellzahl vitaler sowie geschädigter Zellen wird in der Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt und als Wachstumskurve bzw. Überlebenskurve aufgetragen. Als ein Maß für die Wirkung auf verschiedene Tumorzellkulturen kann die "surviving fraction", also der Anteil überlebender Zellen der behandelten Gruppe gegenüber unbehandelten Kontrollen, nach 3 bzw. 6 Tagen Inkubation mit 90 Vol-% D₂O-Medium angegeben werden.

20

25

Tumor	SF 3d	SF 6d [90 Vol-% D ₂ O]
HTZ 209 Glioblastoma multiforme	0,55	0,07
HTZ 243 Astrozytom, WHO III	0,58	0,32
HTZ 19 malignes Melanom	0,25	0,05
HTB 69 malignes Melanom	0,14	0,08
HTZ 25 Bronchialkarzinom	0,35	0,20
CaCo-2 Colonkarzinom	0,08	0,05
HT 29 Colonkarzinom	0,04	0,01

Eine weitere geeignete Methode zur Überprüfung der Wirksamkeit eines Zytostatikums ist die Koloniebildung in Soft Agar. Nach Aussäen einer definierten Zahl von Zellen wird nach 3 Wochen die Zahl der gebildeten Kolonien ausgezählt und im Verhältnis zur Kontrolle als "Colony Forming Efficiency" (CFE) ausgewertet.

Aus Abb. 30 sieht man, daß es bei den beiden getesteten Tumoren HT-29 (Colonkarzinom) und HTZ19 (malignes Melanom) zu einer hohen Wirksamkeit von D₂O kommt und unter 90 Vol.-% D₂O ist ein Rückgang um 4 bzw. 5 Zehnerpotenzen vitaler koloniebildender Tumorzellen festzustellen.

Beispiel 3: Melanome

Getestet wurden zwei verschiedene Tumoren, HTZ-19 und HTB-69. Die Tumoren wurden in MEM mit 10 Vol.-% FCS Zusatz expandiert. ³H Thymidin Assays wurden in 96-well-Platten, Wachstumskurven z.T. auch in 24-well-Platten durchgeführt.

Mittels ³H-Thymidin-Einbau (Abb. 1,2) als Modell für die Proliferationsaktivität konnte bei beiden Tumoren eine Inhibition von über 90 % bei 6-tägiger Exposition mit 90 Vol.-% Deuterium (D₂O) im Medium nachgewiesen werden (HTZ-19: 91 % HTB-69:96%).

Die Wachstumskurven (Abb. 3,4) zeigten bei HTZ-19 bereits bei 50 Vol.-% D₂O (99,86 g Deuterium/kg) eine deutliche Verlangsamung des Wachstums, bei 90 Vol.-% D₂O (179,75 g D₂O/kg) kam es zur Stagnation des Wachstums über den vollen Beobachtungszeitraum von 13 Tagen. Bei HTB-69 konnte ein deutlicher absoluter Rückgang der Zellzahl verzeichnet werden, während die unbehandelten Kontrollen exponentielle Vermehrung zeigten.

Die Überlebensrate (Abb. 5,6), ("surviving rate") stellt ein Maß für den durch

dium zeigten sich bei HTZ-19 68% tote Zellen ($sr = 32$), bei HTB-69 58% tote ($sr = 42\%$), nach 12 Tagen wurden 78% bzw. 73% tote Zellen registriert (ermittelt mittels Trypanblau-Zellzählung).

- 5 Der resultierende Gesamteffekt durch Deuterium wurde als Überlebensfraktion (Abb. 7,8) ("surviving fraction") gemessen; nach 6 Tagen in 90 Vol.-% Deuteriummedium ergab sich bei HTZ-19 eine Überlebensfraktion von 0,04, bei HTB 0,07, nach 12 Tagen bei beiden Tumoren kleiner als 0,01. Dies bedeutet einen Rückgang vitaler Tumorzellen unter Deuteriumbehandlung von mehr als zwei
- 10 Zehnerpotenzen (2 log-cell kill). Bereits nach 1 Tag lag bei HTB-69 die Überlebensfraktion unter 0,5.

- Zur Verifizierung der aus Zellzählung und Wachstumskurven erhaltenen Information wurden Versuche mittels Durchflußzytometrie durchgeführt. Zusätzlich
- 15 zur Information über die Vitalität der Zellen erhält man dabei bei Verwendung entsprechender Farbstoffe die Information über den DNA-Gehalt der Zelle, und damit über ihre Zugehörigkeit zu einer bestimmten Phase des Zellzyklus. Für diese Untersuchungen wurde Hoechst 33342 als unspezifischer DNA Marker zusammen mit Ethidiumbromid als Vitalitätsmarker eingesetzt. Stellvertretend
- 20 für alle Ergebnisse aus Durchflußzytometrieexperimenten sollen hier die Ergebnisse am Melanom HTZ-19 dargestellt werden.

- In den Abbildungen 27a, 28a, 29a werden die Häufigkeitsverteilungen ("Verteilung") von HTZ-19 Melanomzellen im Zellzyklus vorgestellt. Aus den primären
- 25 Daten der Häufigkeit des Auftretens einer bestimmten DNA-Menge (im Diagramm als einzelne Meßpunkte dargestellt) wird eine Ausgleichskurve (Diagramm: gestrichelte Linie) errechnet. An diese Ausgleichskurve werden die Verteilungsfunktionen der einzelnen Zellzykluskompartimente (Diagramm: durchgezogene Linien je für G_1 , S und G_2 Phase) angepaßt und aus diesen
- 30 Verteilungsfunktionen die relativen Häufigkeiten ermittelt. Damit ergibt sich die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Zellzykluskompartimente, die jeweils am Rand der Abbildungen ablesbar ist.

Dargestellt wird in den Abbildungen 27a-29a immer die Anzahl der Zellen (Ordinate) in Abhängigkeit ihres DNA-Gehalts (Abszisse). Die Einheit der Ordinate ist daher die Zellzahl, die Einheit der Abszisse ist der relative DNA-Gehalt in willkürlichen Einheiten der Fluoreszenzintensität.

5

Die Verteilung der untersuchten HTZ-19 Zellen ergab bei unbehandelten Zellen einen Anteil von 58,1% in der G₁-Phase, 30,3% in der S-Phase und 11,6% in der G₂-Phase (Abb. 27a).

10 Nach 3-tägiger Behandlung mit 50 Vol-% D₂O ergab sich eine Zellzykluszusammensetzung mit einem Anteil von 51,1% in der G₁-Phase, 3,4% in der S-Phase und 9,5% in der G₂-Phase (Abb. 28a). Somit wurde durch die Einwirkung von 50 Vol-% D₂O der Anteil der Zellen in der G₁-Phase erhöht, die Anteile der S-Phase und G₂-Phase Zellen jedoch vermindert.

15

Eine 3-tägige Behandlung der gleichen Zellen mit 90 Vol-% D₂O zeigte eine weitere Reduzierung der Anzahl der Zellen in der G₂-Phase auf nur noch 2,8%, der Rest der Zellen befand sich in der frühen S-Phase und in der G₁-Phase (Abb. 29a). Eine Differenzierung zwischen G₁-Phase und S-Phase Zellen ist bei einem derartigen Zellzyklusverlauf schwierig und unter Umständen artifiziell. Sicherlich kann zusammenfassend aus den Zellzyklusexperimenten der Schluß einer Verminderung von Zellen der G₂-Phase und einer dosisabhängigen Akkumulierung von HTZ-19 Melanomzellen in der G₁-Phase und/oder der frühen S-Phase gezogen werden.

20

25

Mittels gleichzeitiger Anwendung von Ethidiumbromid und Hoechst 33342 als Doppelfluoreszenz und zweidimensionaler Auftragung der Meßdaten erhält man eine gleichzeitige Aussage über DNA-Menge und Vitalität von Zellen.

30

Die Abbildungen 27b, 28b, 29b zeigen als Ordinate ("Y-Achse") die Intensität der Ethidiumbromid-Fluoreszenz und als Abszisse ("X-Achse") die Intensität der Hoechstfluoreszenz. Die Anzahl der Zellen wird durch die Schwärzung und die

Für beide Achsen ergibt sich die Intensität entsprechend dem Gehalt an fluoreszenzgefärbter DNA. Im Falle der Ethidiumbromidfluoreszenz ist die Intensität daher proportional dem DNA-Gehalt nicht-vitaler Zellen.

- 5 Für unbehandelte HTZ-19 Zellen ergibt sich ein normaler Zellzyklus der vitalen Zellen (Abb. 27b, Bereich 1 bzw. als Projektion A), nur vereinzelt finden sich nicht-vitale Zellen (markierter Bereich 2, insgesamt 1,2%). Die Verteilung der Ethidiumbromidfluoreszenz (B) zeigt ebenfalls die Vitalität der Probe an.
- 10 Ein völlig anderes Bild ergibt sich nach 3-tägiger Behandlung mit 90 Vol-% D₂O (Abb. 29b): Nahezu alle Zellen sind nicht mehr vital und zeigen daher Ethidiumbromidfluoreszenz.

- 15 Eine Auswertung der Überlebensrate dieser beiden Experimente ergibt mit 97,8% nicht-vitalen Zellen in D₂O gegenüber 1,2% in der Kontrollgruppe eine Überlebensrate von 3,8%.

- Demgegenüber wurde mit Trypan Blau Zellzählung bei HTZ-19 Zellen nach 3-tägiger Behandlung noch eine Überlebensrate von 72,8% gemessen, die
- 20 Auswirkung von D₂O dementsprechend unterschätzt.

- Auffällig ist die Zellzyklusverteilung der abgetöteten Zellen: Fast alle Zellen befinden sich in der G₁-Phase, eine definierte G₂-Phase ist kaum zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigt eine wichtige Zusatzinformation zur Zellzyklusdarstellung
- 25 der 90 Vol-% D₂O behandelten Zellen (Abb. 29a): Es handelt sich bei dieser Zellzyklusanalyse um die Verteilung nicht mehr vitaler Zellen!

- Nach Behandlung mit 50 Vol-% D₂O für drei Tage ergibt sich auch ein Anteil nicht-vitaler Zellen. Auffällig ist wiederum deren Verteilung: Wie nach den Zellzyklusergebnissen (Abb. 28a) und der Beschränkung abgetöteter Zellen auf
- 30 das G₁ Kompartiment (Abb. 28b) erwartet, zeigt der Zellzyklus nicht-vitaler Zellen nennenswerte Anzahl nur in der G₁-Phase (und evtl. frühe S-Phase), ein G₂-peak ist kaum auszumachen. Unerwartet erscheint jedoch ein zusätzliches

Intensitätsmaximum mit etwas geringerer Fluoreszenzintensität als in den Zellen der G₁-Phase (Abb. 28b). Dies kann ein Hinweis auf fragmentierte DNA darstellen.

- 5 Zusammenfassend läßt sich bei Melanomen ein ganz klares Potential für Deuterium-Einsatz erkennen: eine bei 50-90 Vol.-% Deuterium hohe Inhibition als Ausdruck für "growth arrest" und ein hoher Anteil "cell kill" führen zu einem deutlichen Rückgang an vitalen Tumorzellen.
- 10 Diese Untersuchungen wurden mit ähnlichen Ergebnissen auch an anderen Tumorzellen durchgeführt.

Beispiel 4: Kleinzelliges Bronchialkarzinom

- 15 Getestet wurden Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms HTZ-25. Die Tumoren wurden in MEM mit 10 Vol.-% FCS expandiert. ³H Thymidin Assays sowie Wachstumskurven wurden in 96-well-Platten durchgeführt.
- 20 Der ³H-Thymidin-Einbau (Abb. 9) zeigt eine nahezu lineare Dosis-Wirkungsbeziehung die weitgehend zeitunabhängig ist. In der Zeitskala 1 bis 6 Tage ist also bereits ein Sättigungsverhalten eingetreten, die Ausprägung der Effekte erfolgt offensichtlich sehr rasch im Bereich von Stunden. Bei HTZ-25 konnte mit 94 % Inhibition ein sehr hoher Effekt nach 6-tägiger Exposition von 90
- 25 Vol.-% D₂O (179,75 g Deuterium/kg) im Medium erzielt werden.

Die Wachstumskurven (Abb. 10) zeigen einen deutlichen Rückgang der behandelten Zellen bei gutem Wachstum der unbehandelten Tumorzellen.

- 30 Die Überlebensrate (Abb. 11) sinkt auf 80 %, wobei mit Durchflußzytometrie ein "Cell-Kill"-Anteil von 56% nach 2 Tagen gezeigt werden konnte.

Tagen sogar 0,09, so daß der gesamte Effekt auf die Tumorzellen zumindest bei 90 Vol.-% D₂O-Konzentration eine volle Zehnerpotenz Reduktion vitaler Tumorzellen bedeutet.

- 5 Zusammenfassend läßt sich beim kleinzelligen Bronchialkarzinom feststellen, daß ein insgesamt guter Effekt nicht alleine durch die Proliferationshemmung entsteht, sondern auch ein nennenswerter "cell kill" beobachtet werden konnte.

10

Beispiel 5: Colonkarzinome

- Getestet wurden die Colonkarzinome der ATCC Zelllinien CaCo-2 und HT-29. Die Tumoren wurden in MEM mit 10 Vol.-% FCS expandiert. ³H Thymidin Assays sowie Wachstumskurven wurden in 96-well-Platten durchgeführt.
- 15

- Der ³H-Thymidin-Einbau (Abb. 13, 14) zeigt eine nahezu lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung die tendenziell ebenfalls weitgehend zeitunabhängig ist. Die Ausprägung der Effekte erfolgt offensichtlich ebenfalls im Bereich von Stunden, die volle Ausprägung wird insbesondere bei CaCo-2 Zellen jedoch erst nach 3-tägiger Inkubation erreicht. Bei HT-29 konnte mit 98 % Inhibition ein ausgesprochen hoher Effekt nach 6-tägiger Exposition von 90 Vol.-% D₂O (179,75 g Deuterium/kg) im Medium erzielt werden, CaCo-2 erreichte mit 94 % Inhibition nach 6 Tagen Inkubation ähnliche Werte.
- 20

25

Die Wachstumskurven (Abb. 15, 16) zeigen einen fulminanten absoluten Rückgang der Zellen bei beiden Colonkarzinomen an, während sich die unbehandelten Kontrollen in exponentiellem Wachstum befinden.

- 30 Die Überlebensrate (Abb. 17) zeigt einen deutlichen Abfall, insbesondere bei CaCo-2 wurde mit 39 % Überlebensrate nach 9 Behandlungstagen ein signifikanter "cell kill" erreicht.

Die Überlebensfraktion (Abb. 18) zeigt bereits nach 3 Tagen bei beiden Colonkarzinomen Werte unter 0,10 (CaCo-2: 0,08, HT-29: 0,04), nach 9 Tagen lag sie bei beiden Tumoren sogar unter 0,01 also zwei Zehnerpotenzen Reduktion vitaler Tumorzellen bei 90 Vol.-% D₂O-Konzentration.

5

Zusammenfassend läßt sich bei Colonkarzinomen feststellen, daß durch den "cell kill" eine maximale Wirkung bei Colonkarzinomen entsteht.

10 Beispiel 6: Lymphozyten (Kontrolle; normale Zellen)

Getestet wurden frisch isolierte Blutlymphozyten, nach Ficoll-Gradient in RPMI-Medium mit 10 Vol.-% humanem AB-Serum-Zusatz expandiert. Die Lymphozyten wurden mit Interleukin 2 (IL-2) bzw. Phythämagglutinin (PHA) stimuliert.

15

Bei den ³H Thymidin-Assays (Abb. 19) als Modell für die Proliferationsrate zeigte sich für einen Zeitraum von 2-6 Tagen, daß es bei allen PHA-stimulierten Lymphozyten bei Behandlung mit 90 Vol.-% Deuteriummedium (179,75 g Deuterium/kg) zum Auftreten von Inhibitionseffekten kam. Jedoch auch nach 20 6 Tagen Einwirkdauer lag die Inhibition noch unter 60 %.

IL-2 stimulierte Lymphozyten zeigten zeitabhängiges Verhalten; bei 3 und 6 Tagen zeigte sich Inhibition, maximal wurde 65 % Inhibition bei 90 Vol.-% Deuterium ermittelt.

25

Die Wachstumskurven (Abb. 20) zeigen zwar sowohl bei 50 Vol.-% (99,86 g Deuterium/kg) als auch bei 90 Vol.-% deuteriertem Medium einen Abfall gegenüber den Kontrollen, dieser ist jedoch deutlich weniger ausgeprägt als bei den getesteten Tumoren.

30

Die Überlebensrate (Abb. 21) als Maß für den durch Deuterium ausgelösten Zelltod wird nur bei den IL-2 stimulierten Zellen in 90 Vol.-% Deuterium signifi-

% abgetötete Zellen bei 6d IL-2 Stimulation gemessen.

Die Überlebensfraktion (Abb. 22) wurde ebenfalls nur bei IL-2 stimulierten Lymphozyten erniedrigt (bis zu 0,36 bei 6d in 90 Vol.-% Deuteriummedium unter IL-2-Stimulation) die PHA stimulierten Zellen bleiben weitgehend unbeeinflusst (0,8 bei 6d PHA-Stimulation in 90 Vol.-% Deuterium).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das System stimulierter Lymphozyten bezüglich der durch Deuterium verursachten Proliferationshemmung und Zytotoxizität deutlich hinter den Effekten auf Tumorzellen zurückbleibt. Diese Versuche zeigen, daß die Deuterium vermittelten Effekte nicht proliferationsabhängig sind, oder zumindest nicht alle differentiellen Effekte nur durch die stärkere Proliferation bei Tumorzellen verursacht werden: Die IL-2-stimulierten Zellen mit der niedrigeren Teilungsrate werden stärker gehemmt und zeigen höhere "cell-kill-Empfindlichkeit" als die sich schnell teilenden PHA-stimulierten Lymphozyten, die durch niedrige Dosen von Deuterium sogar im Wachstum stimuliert werden und kaum "cell kill" aufweisen.

20 Beispiel 7: Gliome

Getestet wurden Zellen des Glioblastoms (Glioblastoma multiforme) HTZ-209 und des Astrozytoms HTZ-243 (Astrozytoma WHO Grad III). Die Tumoren wurden in MEM mit 10 Vol.-% FCS expandiert. ^3H Thymidin Assays wurden in 96-well-Platten durchgeführt, Wachstumskurven wurden in 24- und 96-well-Platten durchgeführt.

Der ^3H -Thymidin-Einbau (Abb. 23) zeigt eine deutliche Schulterbildung im Dosisbereich zwischen 1 und 50 Vol.-% D_2O die weitgehend zeitunabhängig ist. Hier zeigt sich eine ganz deutliche Tumorselektivität insbesondere in der Anwendung von D_2O über 6 Tage, wobei bei HTZ-243 bereits mit 10 % D_2O über 60 % Inhibition erreicht wurde.

Die Wachstumskurven (Abb. 24) zeigen einen absoluten Rückgang der Zellen bei beiden Gliomen, besonders HTZ-209 an, während sich die unbehandelten Kontrollen in exponentiellem Wachstum befinden.

- 5 Die Überlebensrate (Abb. 25) zeigt einen deutlichen Abfall bei beiden Tumoren, insbesondere bei HTZ-209 wurde mit 33 % survival rate nach 6 Behandlungstagen ein hohes Ausmaß an Abtötung von Tumorzellen erreicht.

- 10 Die Überlebensfraktion (Abb. 26) zeigt bei beiden Hirntumoren einen nahezu linearen Abfall, und erreicht nach 6 Tagen für HTZ-209 Werte unter 0,10, also eine volle Zehnerpotenz Rückgang an vitalen Tumorzellen.

- 15 Zusammenfassend läßt sich bei den untersuchten Hirntumoren feststellen, daß durch die Abtötung von Tumorzellen ein therapeutischer Erfolg erzielt werden kann.

- 20 Es konnte ganz klar durch die Beispiele 1-7 gezeigt werden, daß für die Wirkung von Deuterium auf Zellen zwei völlig verschiedene Mechanismen vorliegen: Der Effekt der Teilungsarretierung ("growth arrest") und der von den Erfindern erstmals entdeckte Effekt der direkten Zelltötung ("cell kill").

- 25 Die Spezifität der Effekte auf bestimmte Zellgruppen wurde in der Literatur bisher nicht systematisch untersucht. Auch hier konnten erstmals Hinweise auf ein tumorspezifisches Verhalten ermittelt werden.

- 30 Hinweise, daß die Ausprägung der Effekte nicht nur proliferationsratenabhängig ist, geben die Lymphozyten, bei denen sowohl "growth arrest" als auch "cell kill" bei den schneller proliferierenden PHA-stimulierten Zellen deutlich geringer ausgeprägt sind.

Beispiel 8: Verhinderung der Metastasierung

Eine geeignete Methode zur Überprüfung der Wirkung eines Zytostatikums auf die Migrationsfähigkeit und damit die Metastasierung eines Tumors ist die Beurteilung der Migration von Tumorsphäroiden. Tumorzellen werden nach Bildung von Sphäroiden auf agarbeschichteten 48 well Platten wieder in unbeschichtete Platten umgesetzt. Innerhalb von 72 Stunden gehen die Tumorzellen wieder zu adhärentem Wachstum über; die dabei bedeckte Fläche ist ein Maß für das Migrations- und Invasionsverhalten eines Tumors und damit für seine Metastasierungsfähigkeit und ihre Hemmung.

In Abb. 31 ist zu sehen, daß durch D_2O nach 72 Std. eine Verringerung der Migrationsfläche auf 20% der sonst besetzten Fläche eintritt, was einer wesentlichen Verringerung der Metastasierungsfähigkeit bzw. Metastasenbildung entspricht. Die in diese auf 20% reduzierte Fläche migrierten Zellen sind zudem devital (nachgewiesen mittels Trypanblau-Anfärbung), da D_2O insbesondere die migrierenden Zellen vollständig abtötet. Durch den D_2O Einsatz wird daher eine potentielle Metastasierung verhindert.

In einem anderen Experiment wurde Mäusen das Sarkom M 5076 subcutan implantiert. Die Hälfte dieser Mäuse wurde mit 50 Vol-% D_2O behandelt.

Aus Abb. 32 sieht man, daß die mit D_2O behandelten Tiere keine Lebermetastasen entwickelten, während die unbehandelten Kontrolltiere bis zu 500 Lebermetastasen bekamen. Durchschnittlich zeigten sich bei den Kontrollen 19,5 Lebermetastasen. Die Anwendung von D_2O verhindert also die Metastasierung völlig.

Beispiel 9: Überprüfung der Wirksamkeit im Tiermodell

16 Mäusen wurden 10^5 Zellen des Sarkoms M 5076 intraperitoneal verabreicht. Davon wurde die Hälfte der Mäuse (8 Tiere) mit 50 Vol-% D_2O behandelt.

Hälfte (8 Tiere) normales Wasser als Trinkwasser gegeben (Kontrolle).

Aus Abb. 33 sieht man, daß von den 8 Kontrolltieren 30 Tage nach der Implantation nur noch 2 lebten, während von den D₂O-behandelten Tieren noch
5 7 am Leben waren. Nach 35 Tagen wurde die Behandlung abgebrochen. An diesem Tag lebte nur noch 1 Kontrollmaus, aber immer noch 7 D₂O-behandelte Mäuse. Die am Ende des Experiments noch lebenden 6 Tiere aus der D₂O-Gruppe können im Sinne des Versuchs als geheilt gelten.

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, enthaltend Deuterium und/oder deuterierte Substanzen und/oder Substanzen, die Deuterium anreichern bzw. freisetzen zur selektiven Abtötung von Tumorzellen und/oder Tumormetastasen.
- 10 2. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, enthaltend Deuterium und/oder deuterierte Substanzen und/oder Substanzen, die Deuterium anreichern bzw. freisetzen zur Verhinderung der Metastasierung und/oder des lokalen Wiederauftretens von Tumoren sowie deren Nachwachsen.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die pharmazeutische Zusammensetzung zur Abtötung von entarteten Zellen in Konzentrationen über 50 Vol.-% (99,86 g Deuterium/kg) D₂O oder eine andere Deuterium-enthaltende Substanz mit 50 % durch D ersetzten H-Atomen angewendet wird.
- 20 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die pharmazeutische Zusammensetzung in Form von Zäpfchen, Salben, Lösungen, Dispersionen oder Emulsionen, Aerosolen, Schäumen, teilchenförmigen Mitteln, Pillen, Pastillen Tabletten, Dragees, 25 Kapseln bzw. Mikrokapseln, Kaugummiarten, Gewebe-, Blatt-, oder Fadengrundlagen in Bandagen oder Verbänden, zum Rauchen oder Inhalieren sowie in Carriern angewendet wird.
- 30 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die pharmazeutische Zusammensetzung zur Therapie lokal, intracutan, transcutan; zur systemischen Anwendung intravenös, durch teilweisen Austausch des Körperwasser- oder Blutwasseranteils, intraarteriell,

intraventrikulär, intraperitoneal, intracavitär, in OP-Höhlen verabreicht wird sowie für die extrakorporale Abtötung von Tumorzellen verwendet wird.

- 5 6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1-5 zur Therapie von malignen
Melanomen, Gliomen, Astrozytomen, Bronchialkarzinomen, Neuroblasto-
men, Magen-Darm-Karzinomen, Sarkomen, Malignomen des hämatopoe-
tischen und lymphopoetischen Systems, Mammakarzinomen, Zervixkar-
zinomen, Uteruskarzinomen, Prostatakarzinomen, Schilddrüsenkarzino-
men sowie Pankreaskarzinomen.
10
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet,
daß die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich Zytostatika oder
Tumortheraeutika enthält.
15
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1-7 in Kombination mit Bestrah-
lungsmethoden.
20
9. Verwendung von Deuterium und/oder deuterierten Substanzen und/oder
Substanzen, die Deuterium anreichern bzw. freisetzen zur Herstellung
einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur selektiven Abtötung von
Tumorzellen und/oder Tumormetastasen.
25
10. Verwendung von Deuterium und/oder deuterierten Substanzen und/oder
Substanzen, die Deuterium anreichern bzw. freisetzen zur Herstellung
einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verhinderung der Me-
tastasierung und/oder des lokalen Wiederauftretens von Tumoren sowie
deren Nachwachsen.
30
11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß
die pharmazeutische Zusammensetzung zur Abtötung von entarteten
Zellen in Konzentrationen über 50 Vol.-% (99,86 g Deuterium/kg) D₂O

ersetzten H-Atomen angewendet wird.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 9-11, dadurch gekennzeichnet,
daß die pharmazeutische Zusammensetzung in Form von Zäpfchen,
5 Salben, Lösungen, Dispersionen oder Emulsionen, Aerosolen,
Schäumen, teilchenförmigen Mitteln, Pillen, Pastillen Tabletten, Dragees,
Kapseln bzw. Mikrokapseln, Kaugummiarten, Gewebe-, Blatt-, oder Fa-
dengrundlagen in Bandagen oder Verbänden, zum Rauchen oder Inhalie-
ren sowie in Carriern angewendet wird.
- 10 13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9-12, dadurch gekennzeichnet,
daß die pharmazeutische Zusammensetzung zur Therapie lokal, intracu-
tan, transcutan; zur systemischen Anwendung intravenös, durch teilwei-
sen Austausch des Körperwasser- oder Blutwasseranteils, intraarteriell,
15 oral, rectal; zur Anwendung in Hohlräumen, intrapleural, intrathekal,
intraventrikulär, intraperitoneal, intracavitär, in OP-Höhlen verabreicht
wird sowie für die extrakorporale Abtötung von Tumorzellen verwendet
wird.
- 20 14. Verwendung nach einem der Ansprüche 9-13 zur Therapie von malignen
Melanomen, Gliomen, Astrozytomen, Bronchialkarzinomen, Neuro-
blastomen sowie Magen-Darm-Karzinomen, Sarkomen, Malignomen des
hämatopoetischen und lymphopoetischen Systems, Mammakarzinomen,
Zervixkarzinomen, Uteruskarzinomen, Prostatakarzinomen, Schilddrüsen-
25 karzinomen sowie Pankreaskarzinomen.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 9-14, dadurch gekennzeichnet,
daß die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich Zytostatika oder
Tumorthérapeutika enthält.
- 30 16. Verwendung nach einem der Ansprüche 9-15 in Kombination mit Be-
strahlungsmethoden.

1/21

Abb.1

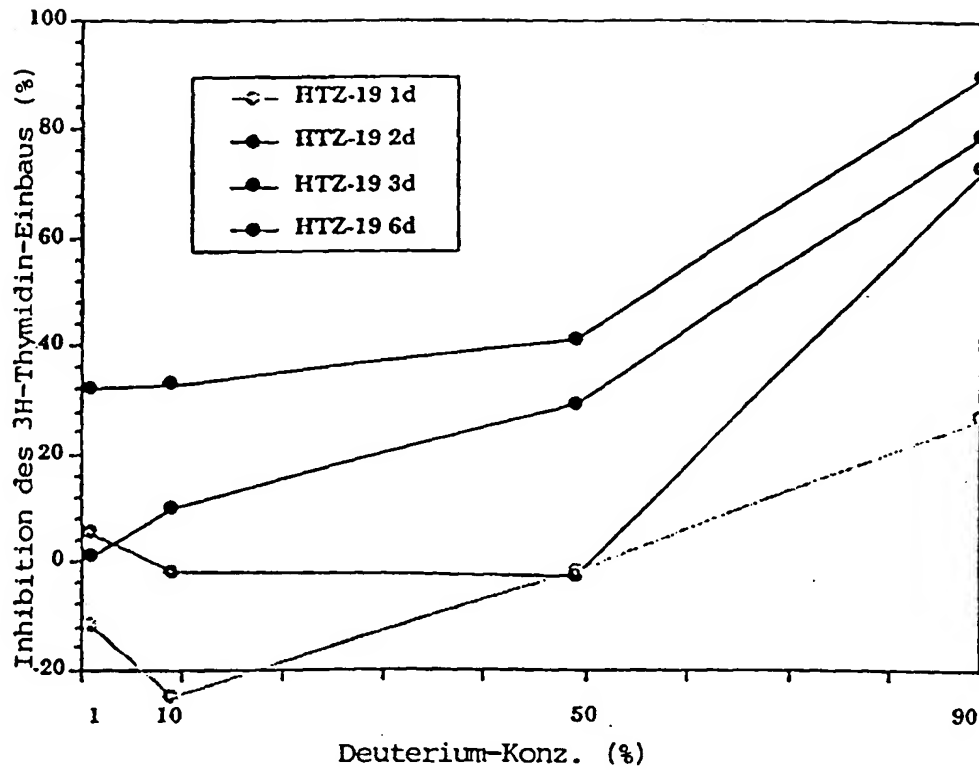
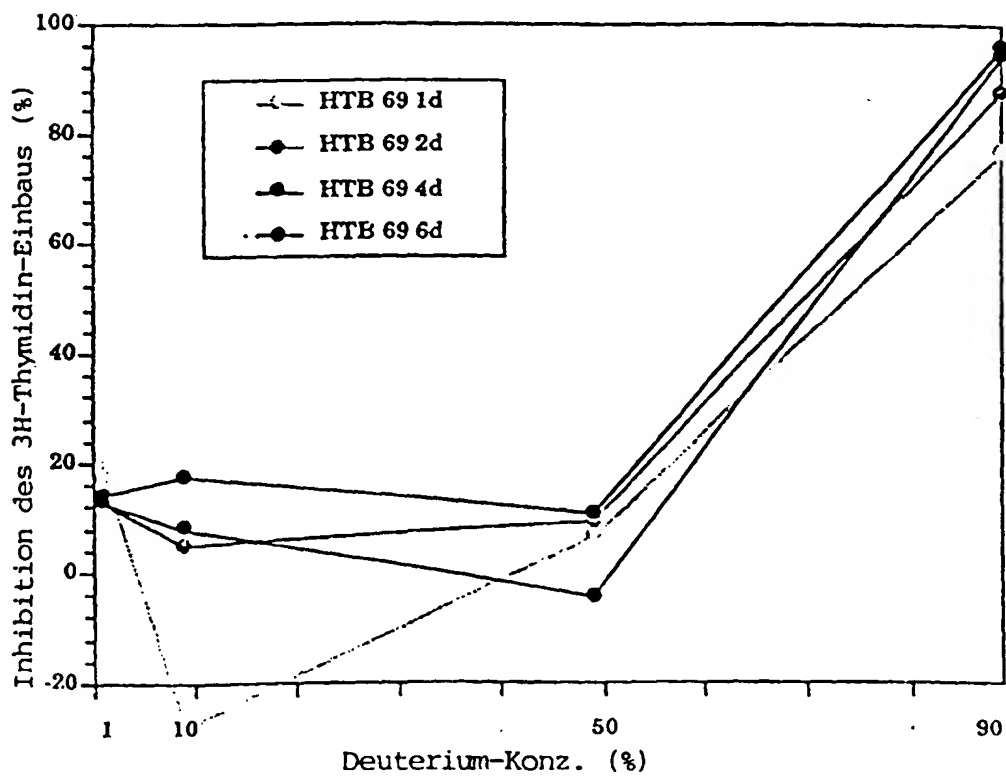


Abb. 2



2/21

Abb. 3

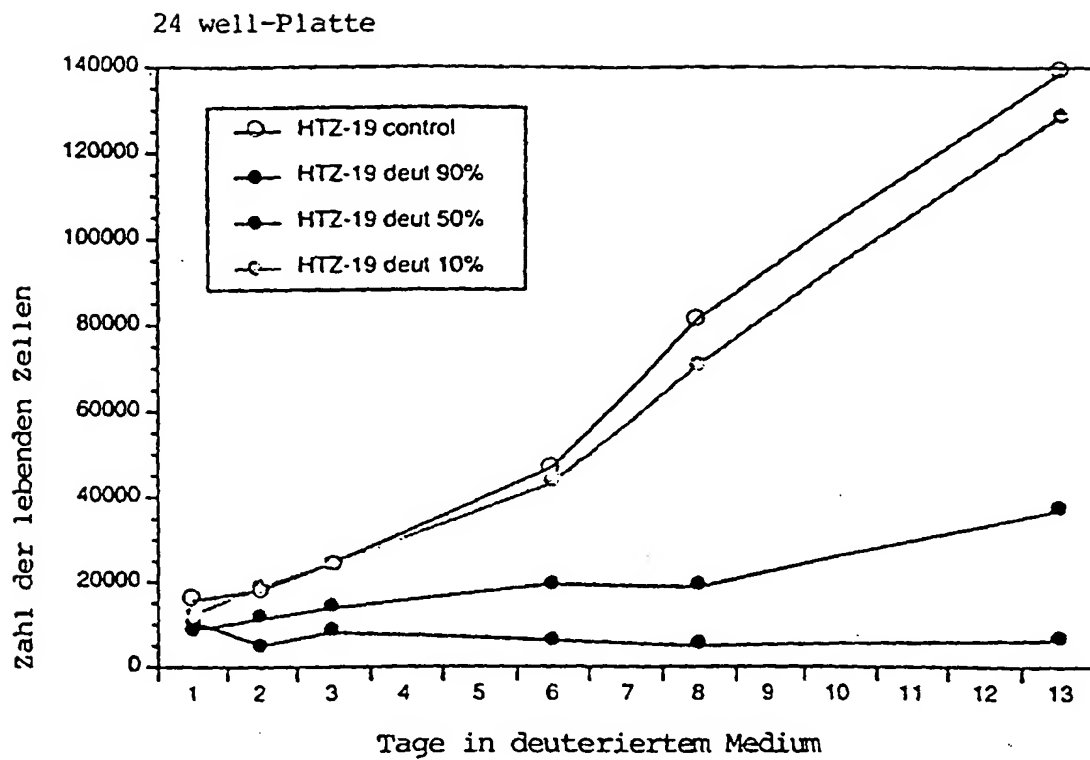
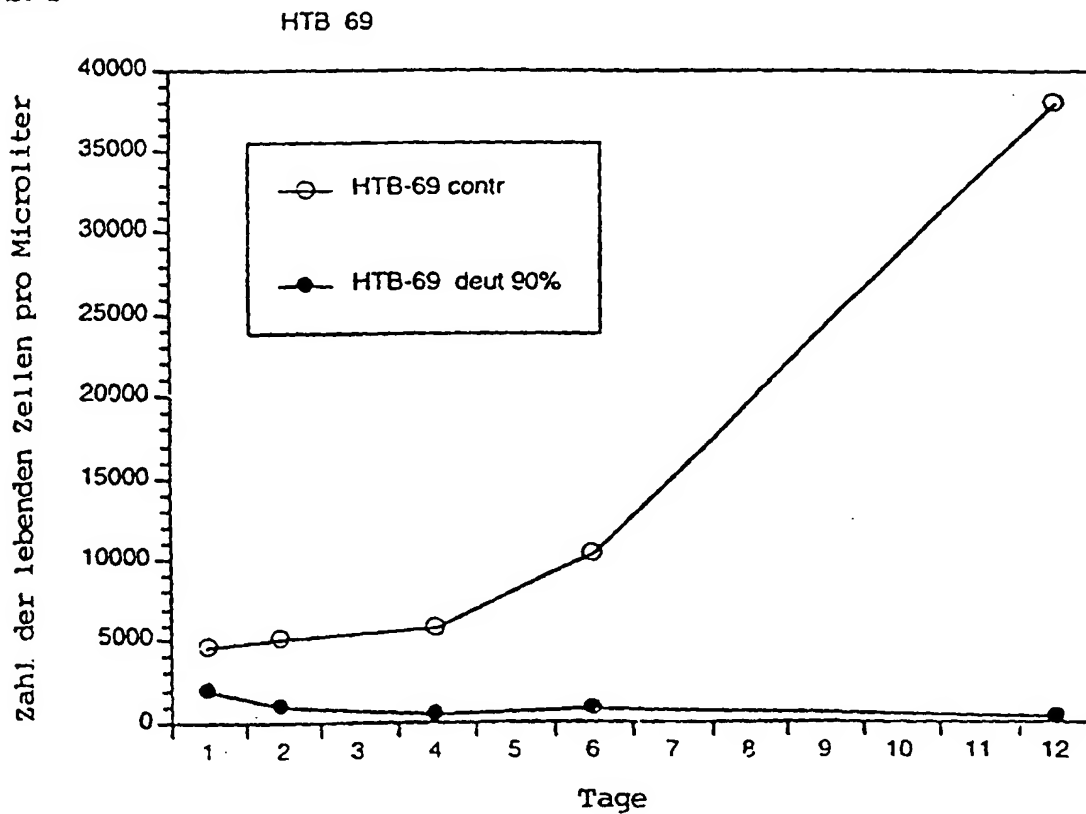


Abb. 4



3 / 21

Abb. 5

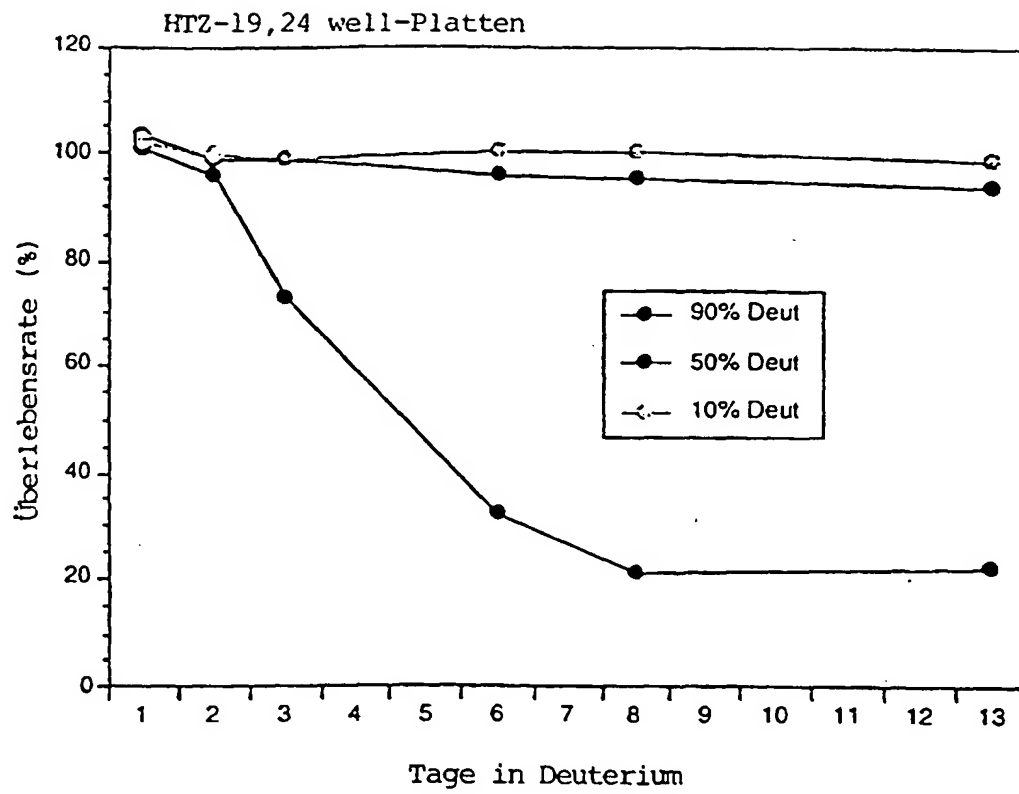
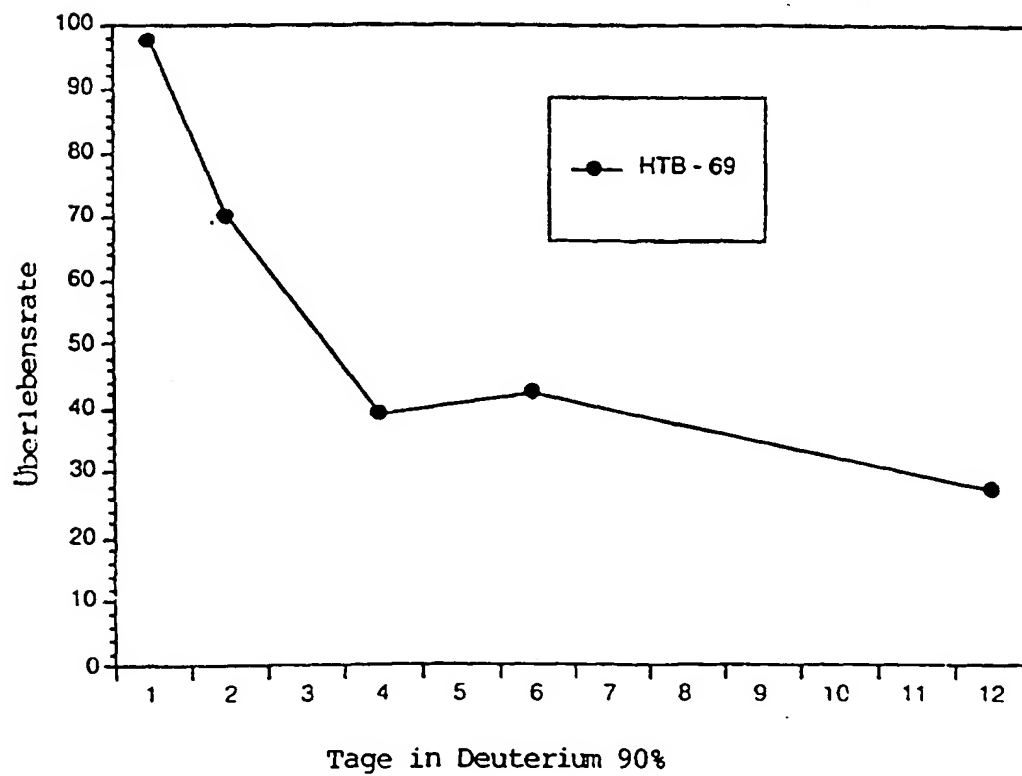


Abb. 6



4/21

Abb. 7

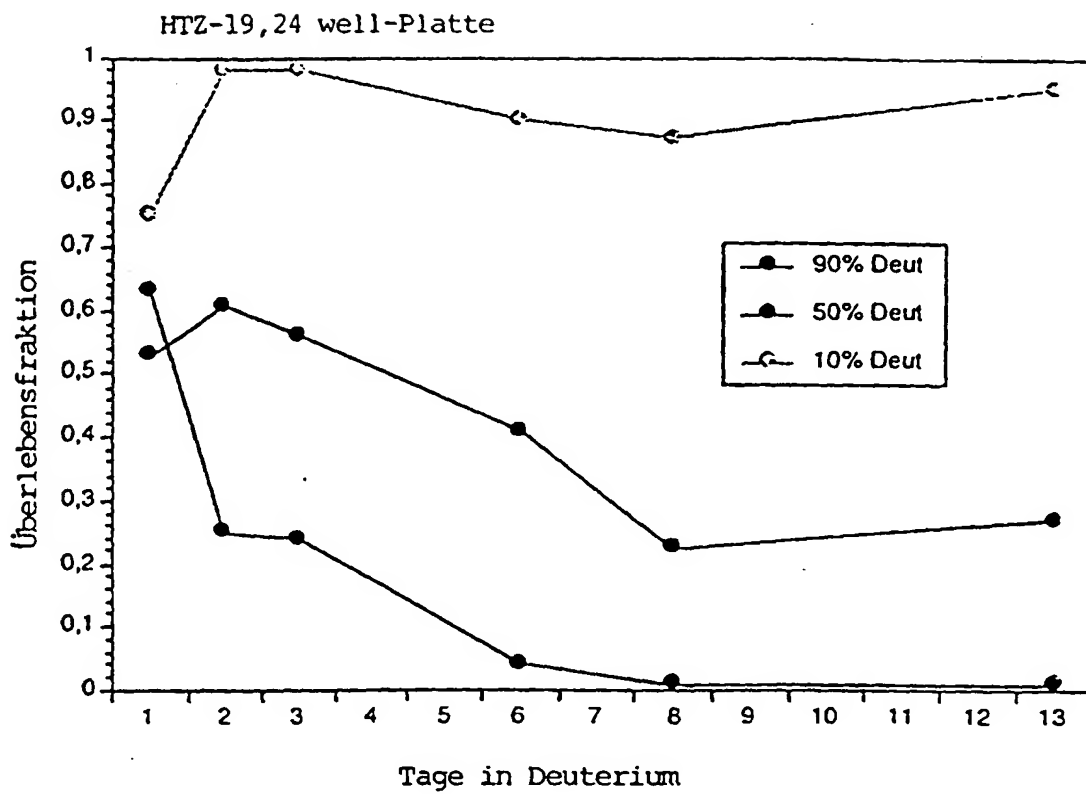
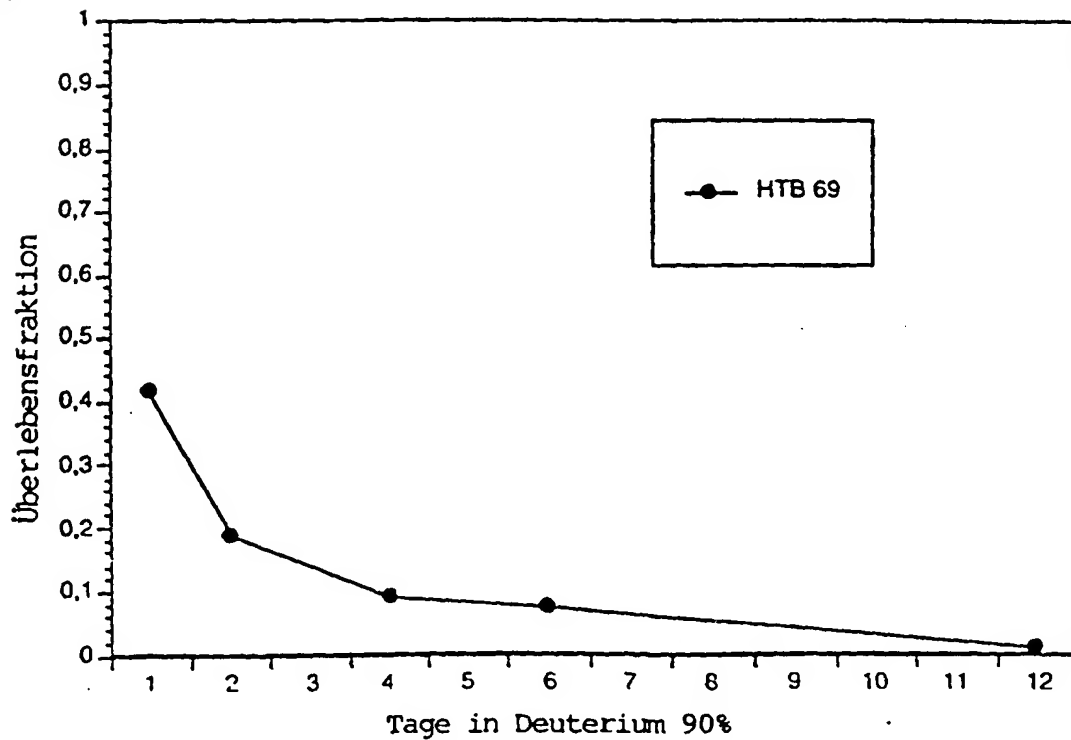


Abb. 8



5 / 21

Abb. 9

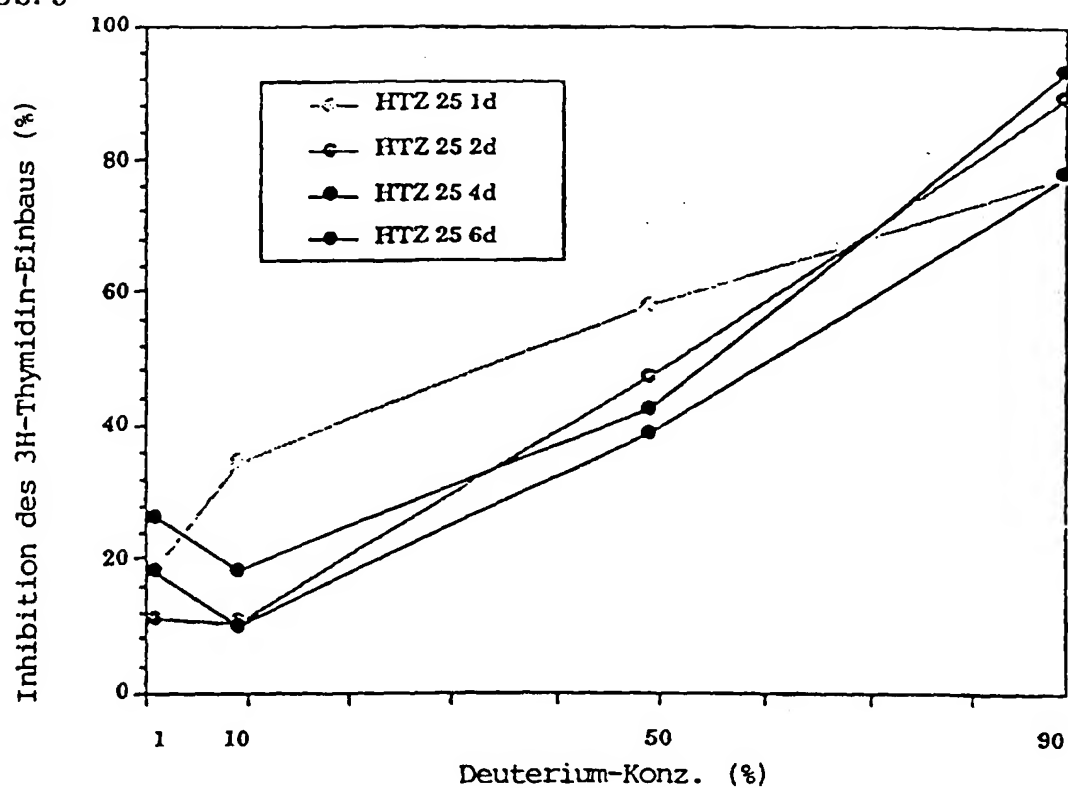


Abb. 10

96 well-Platte

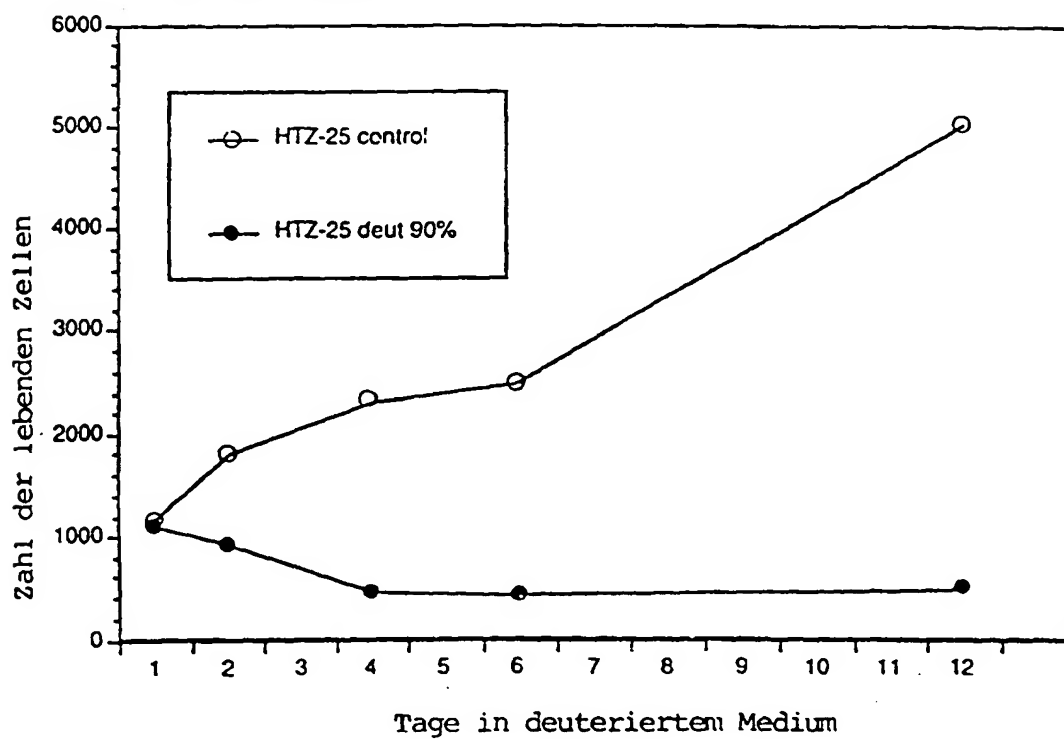


Abb. 11

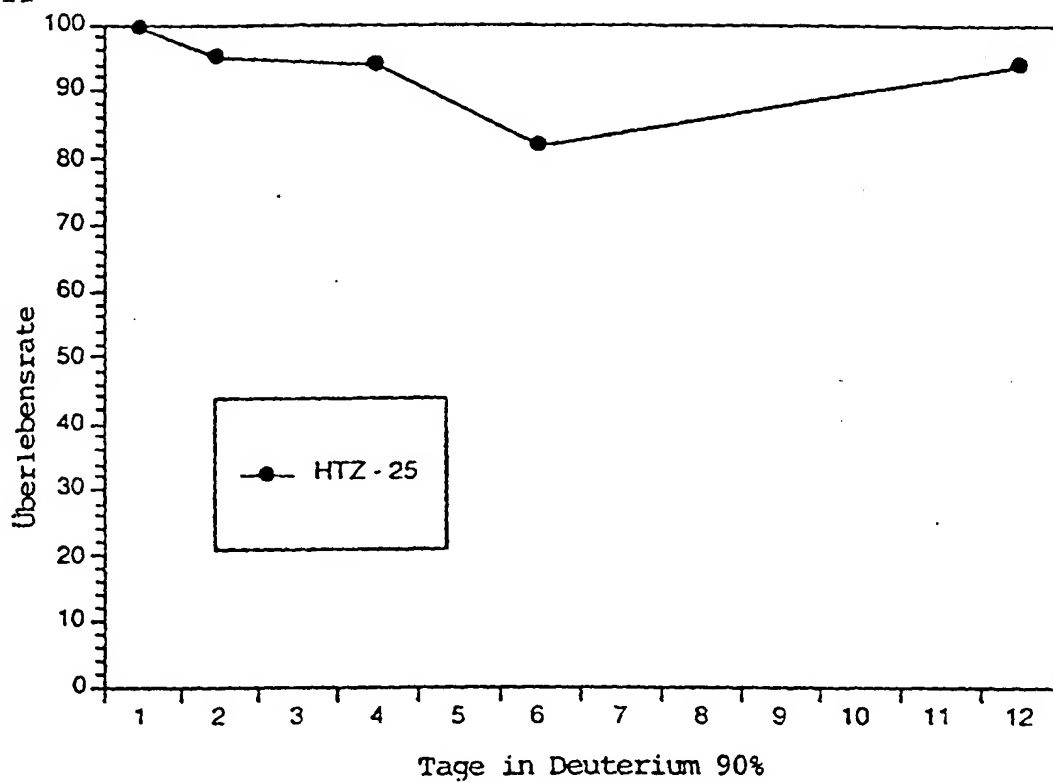
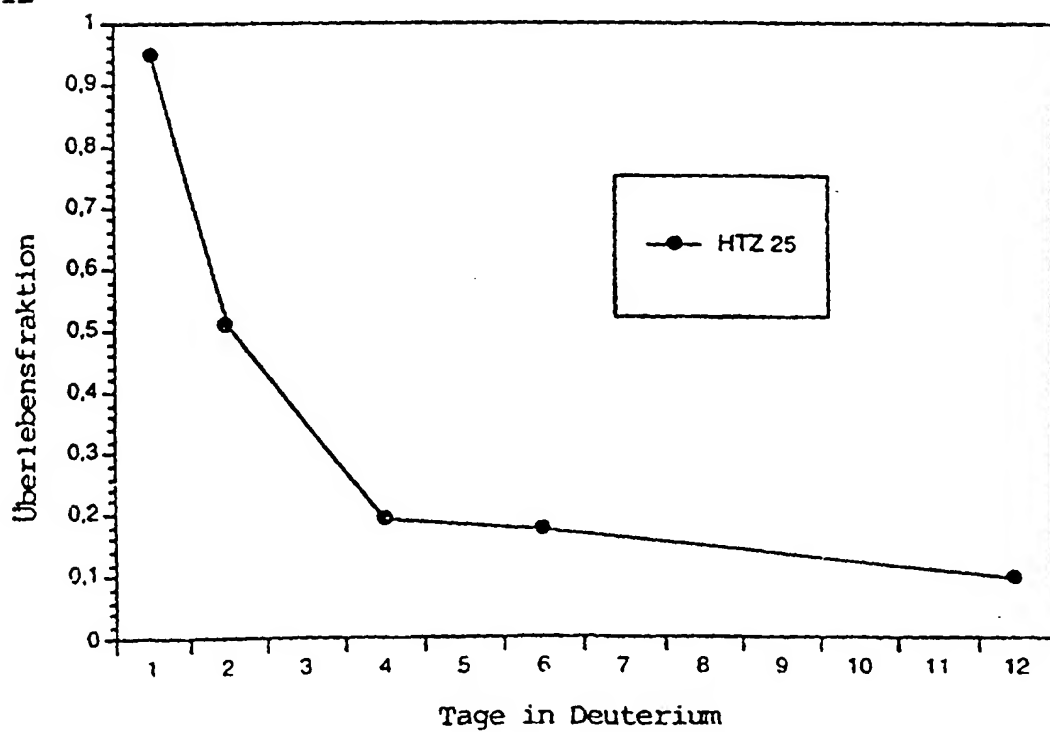


Abb. 12



7/21

Abb. 13

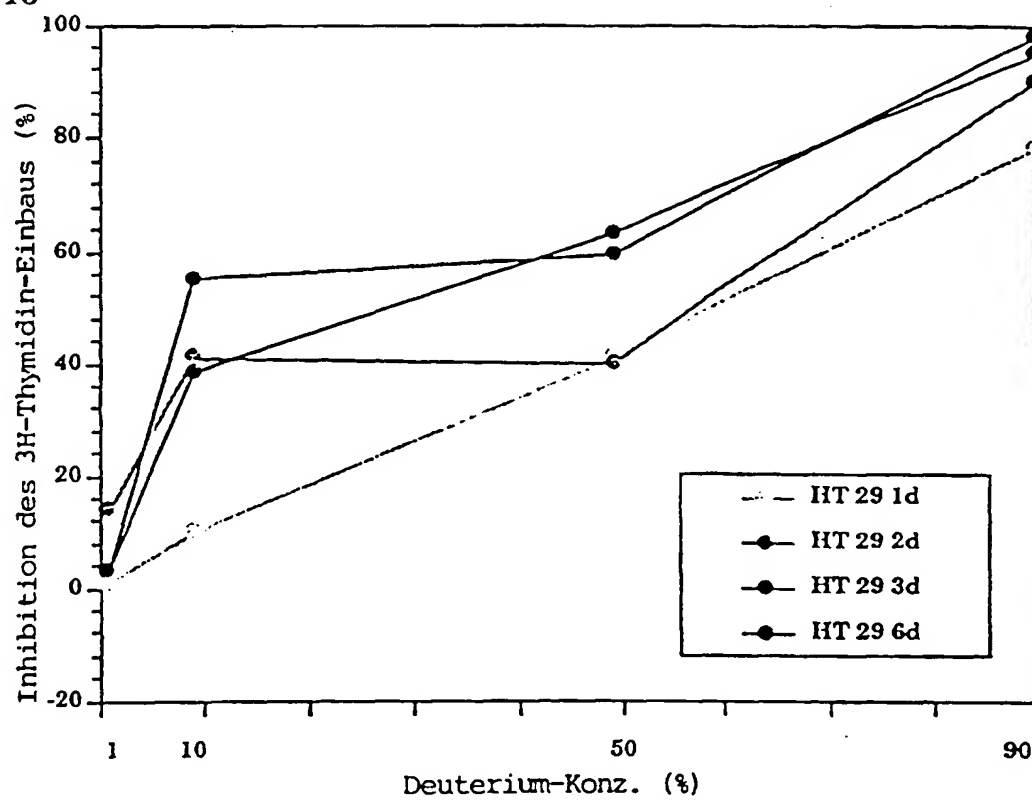
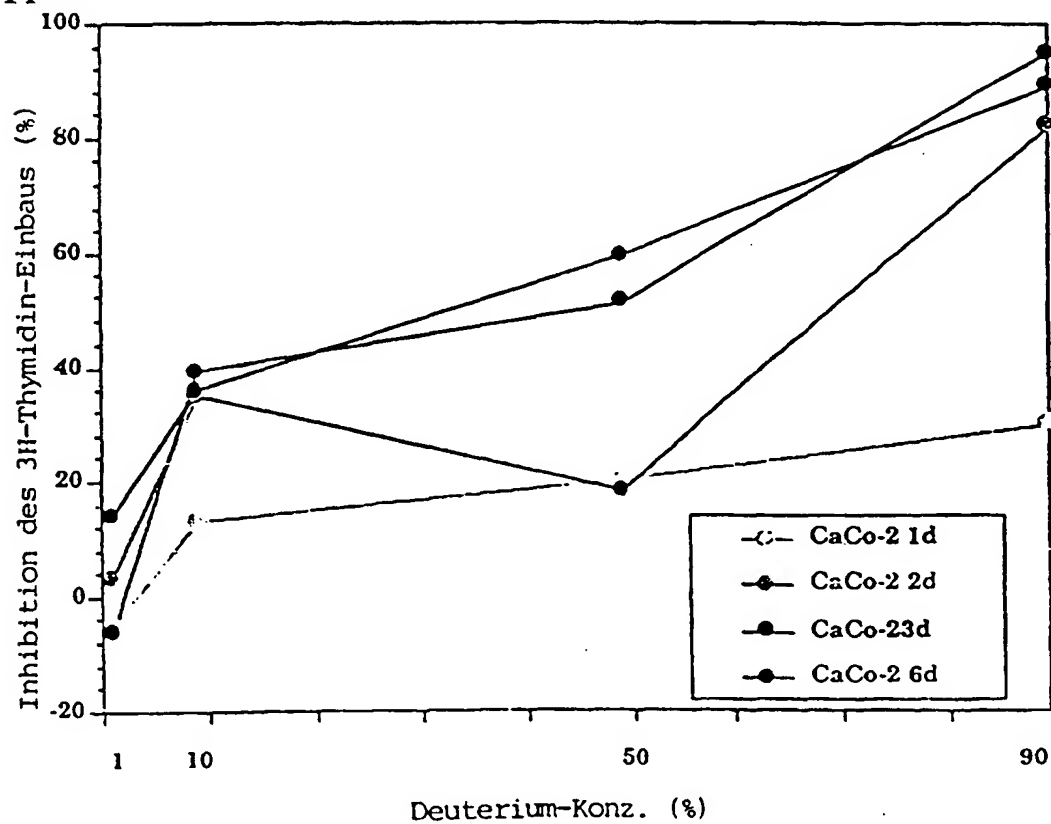


Abb. 14



8 / 21

Abb. 15

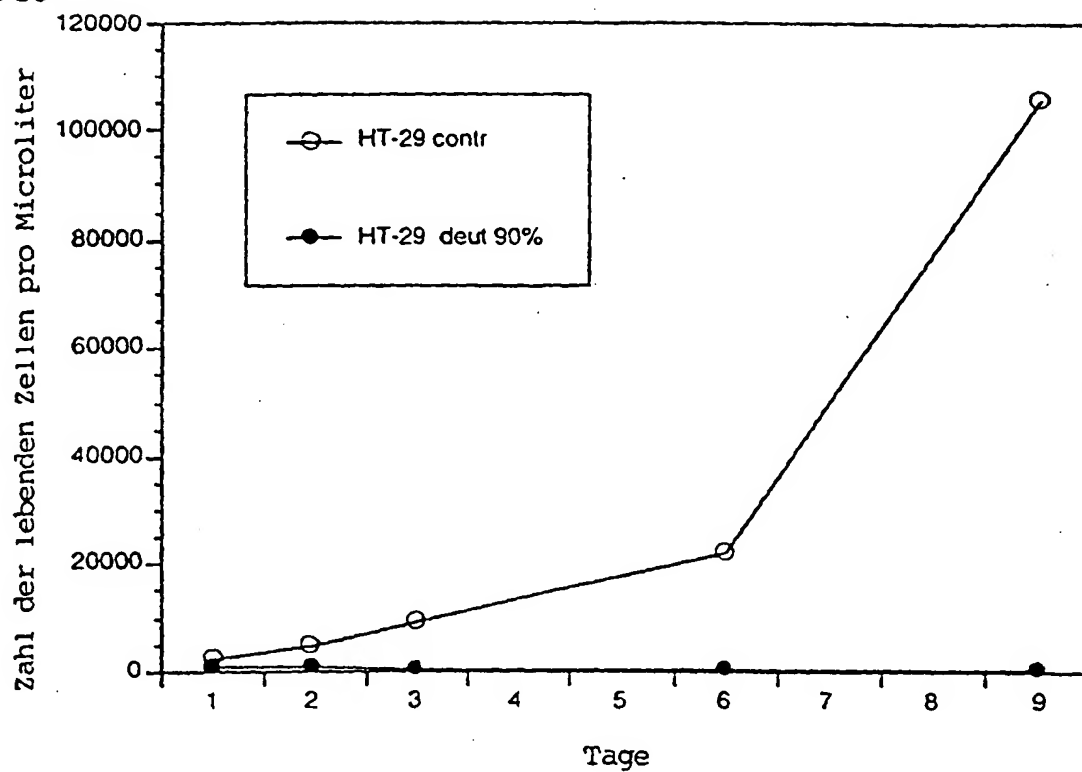


Abb. 16

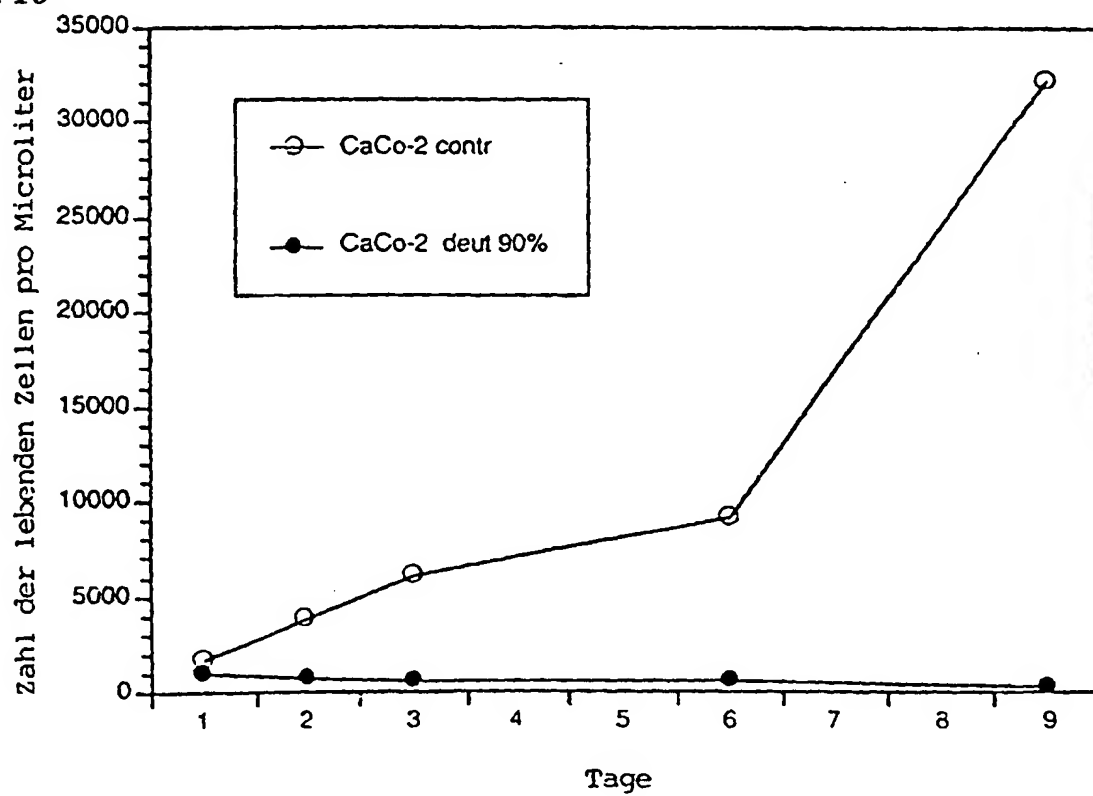


Abb. 17

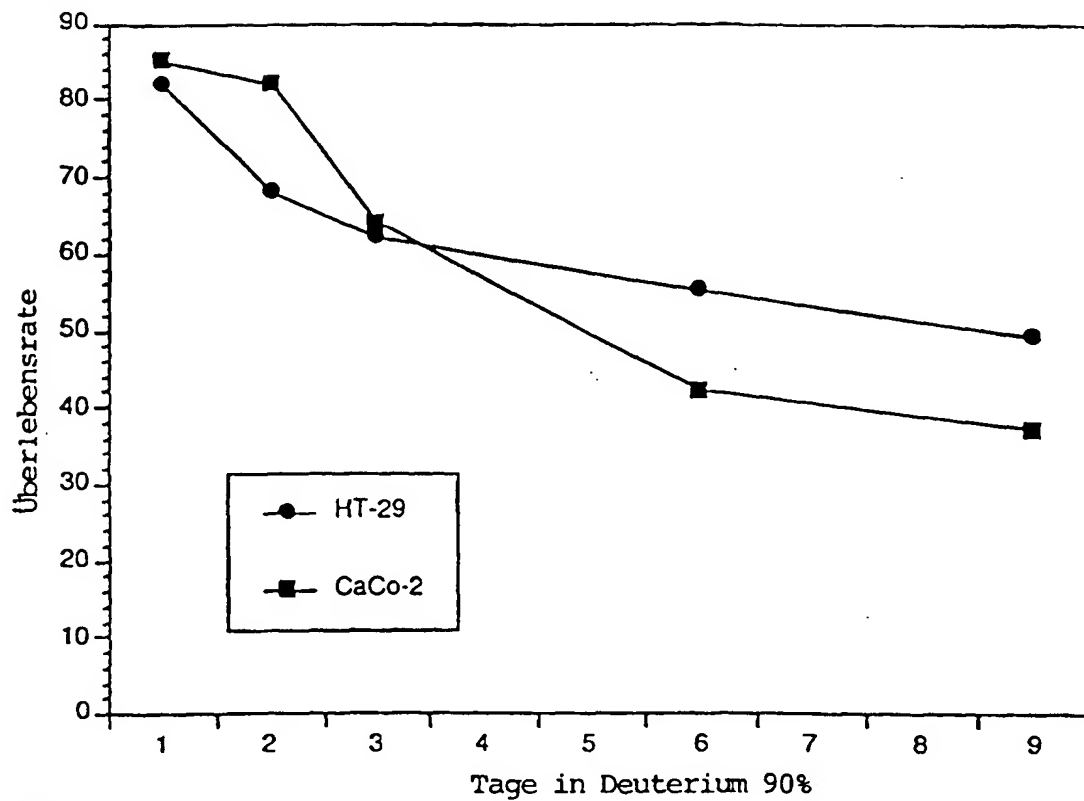
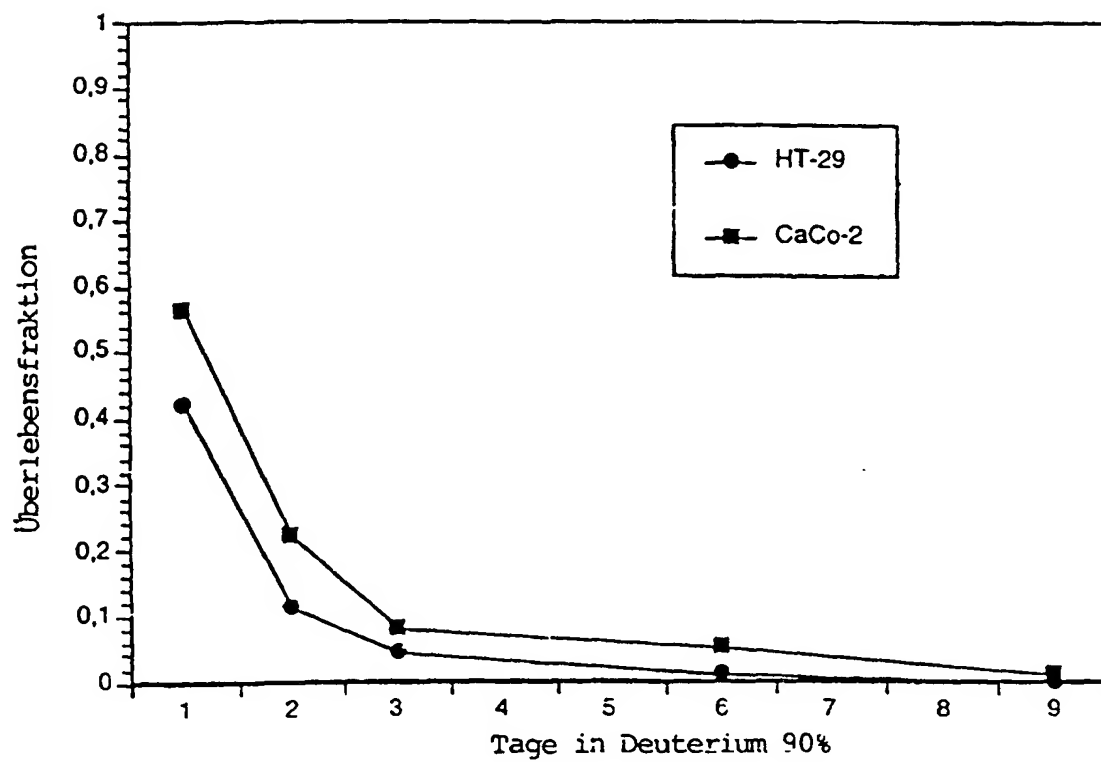
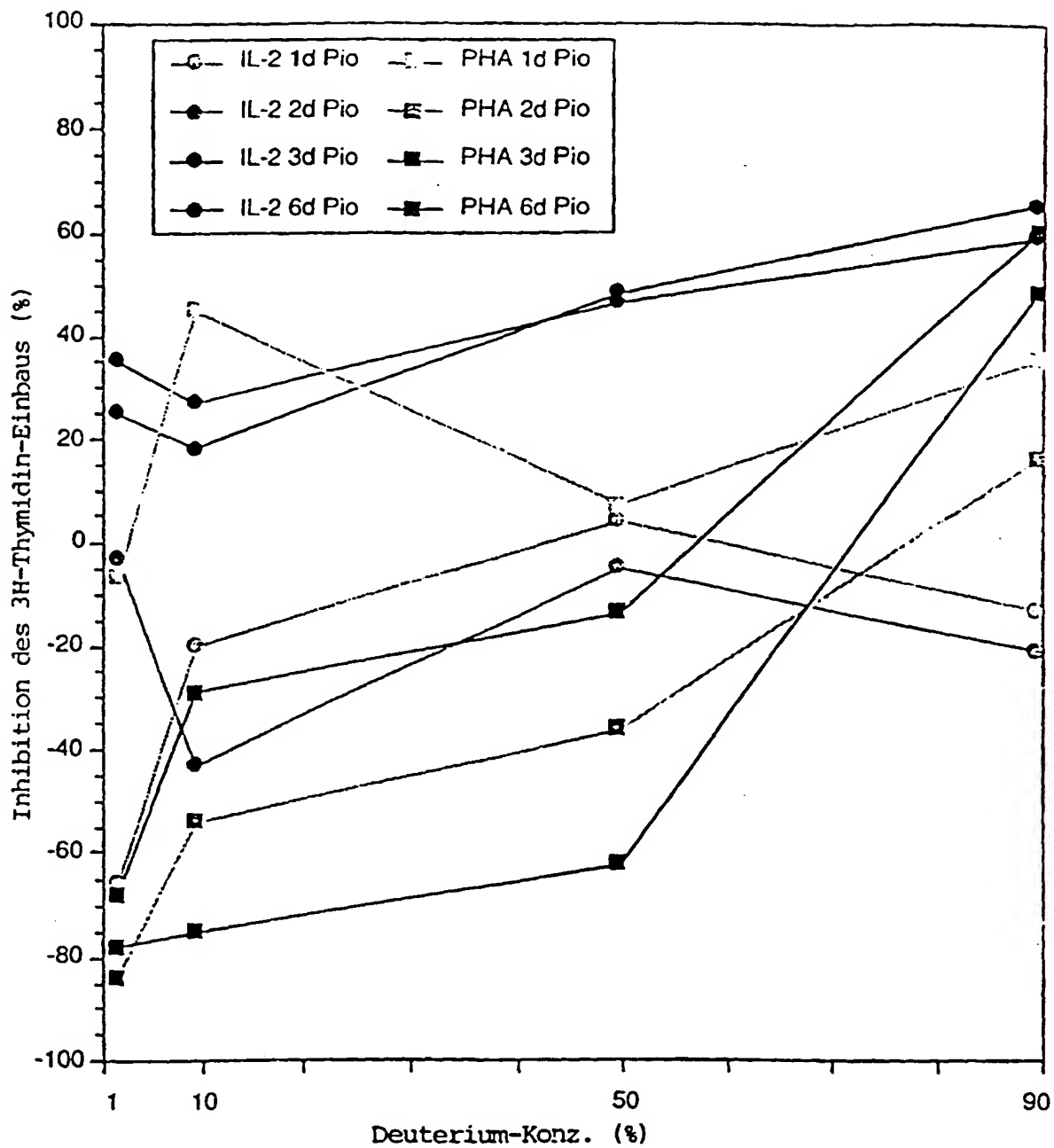


Abb. 18



10/21

Abb. 19



11 / 21

Abb. 20

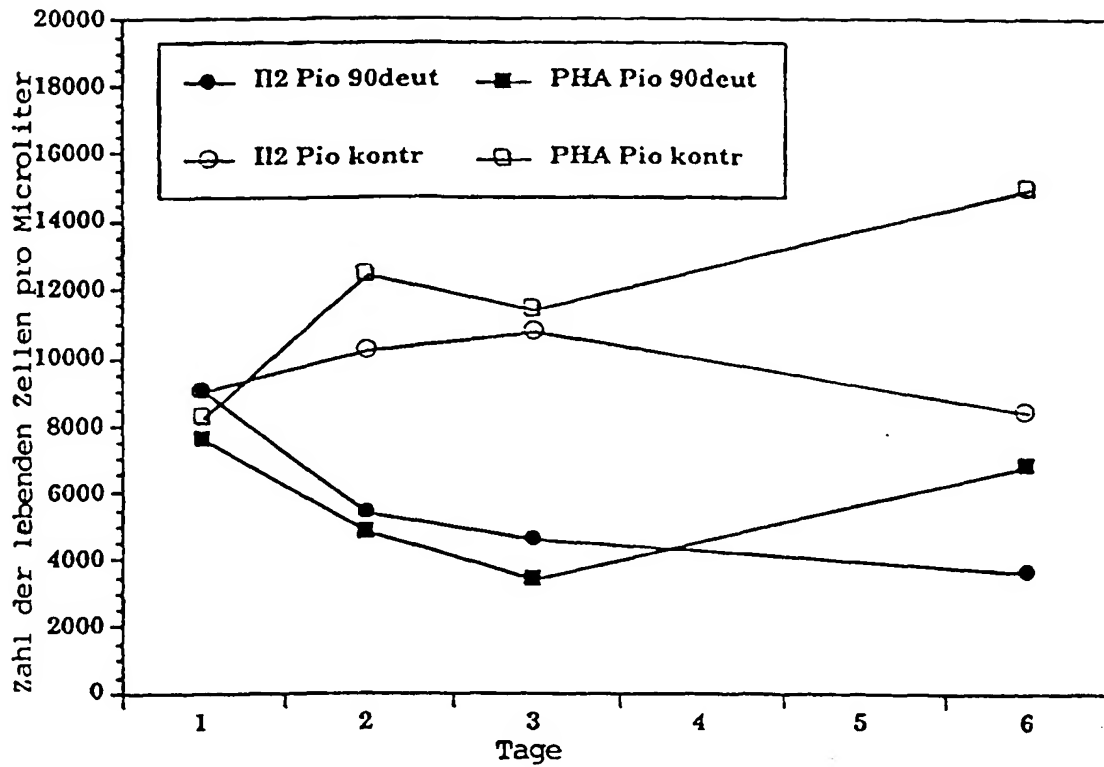
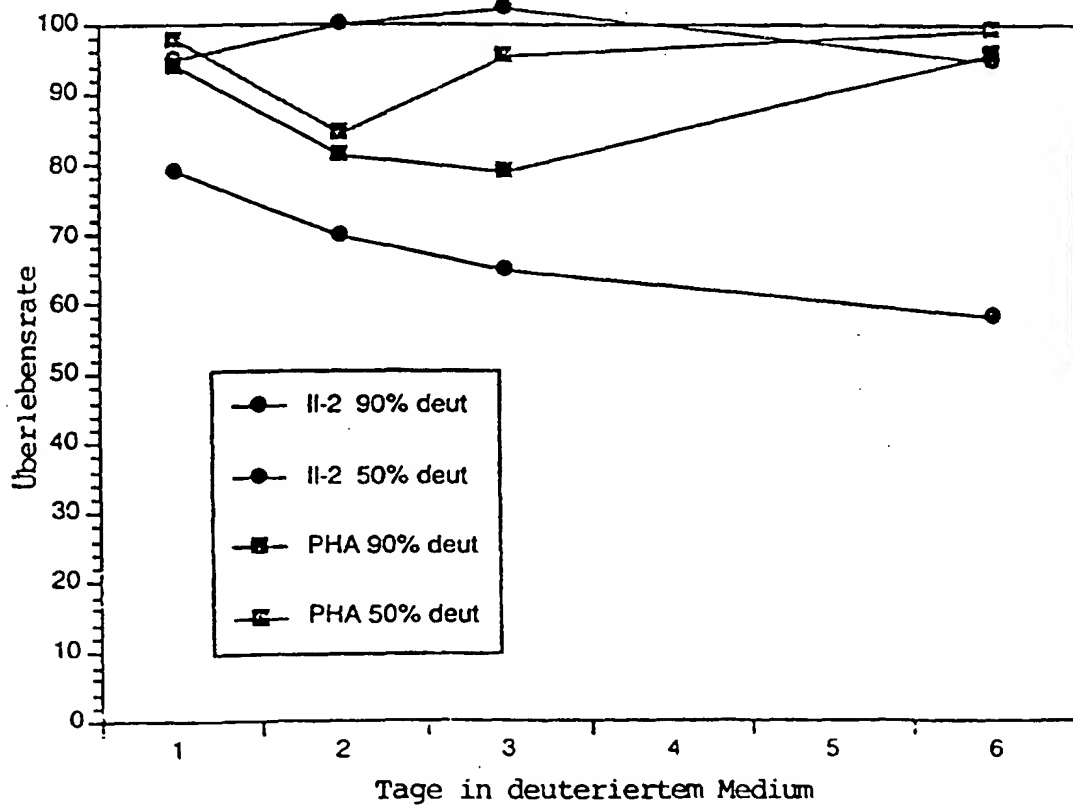
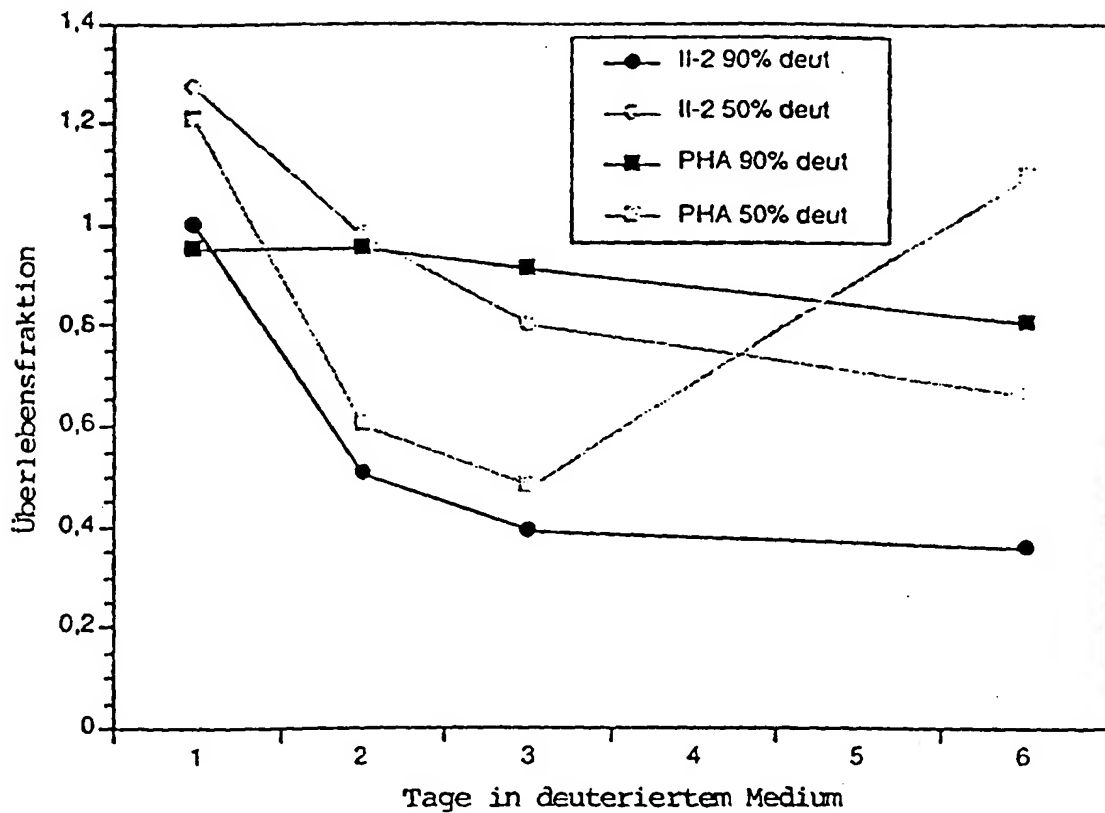


Abb. 21



12/21

Abb. 22



13/21

Abb. 23

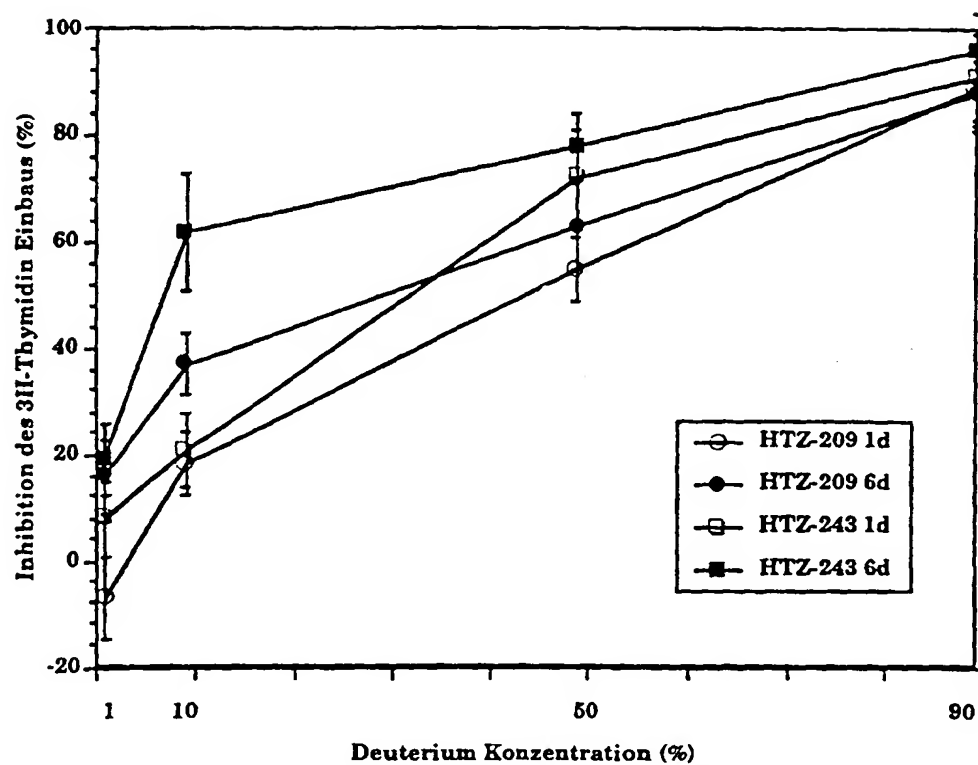
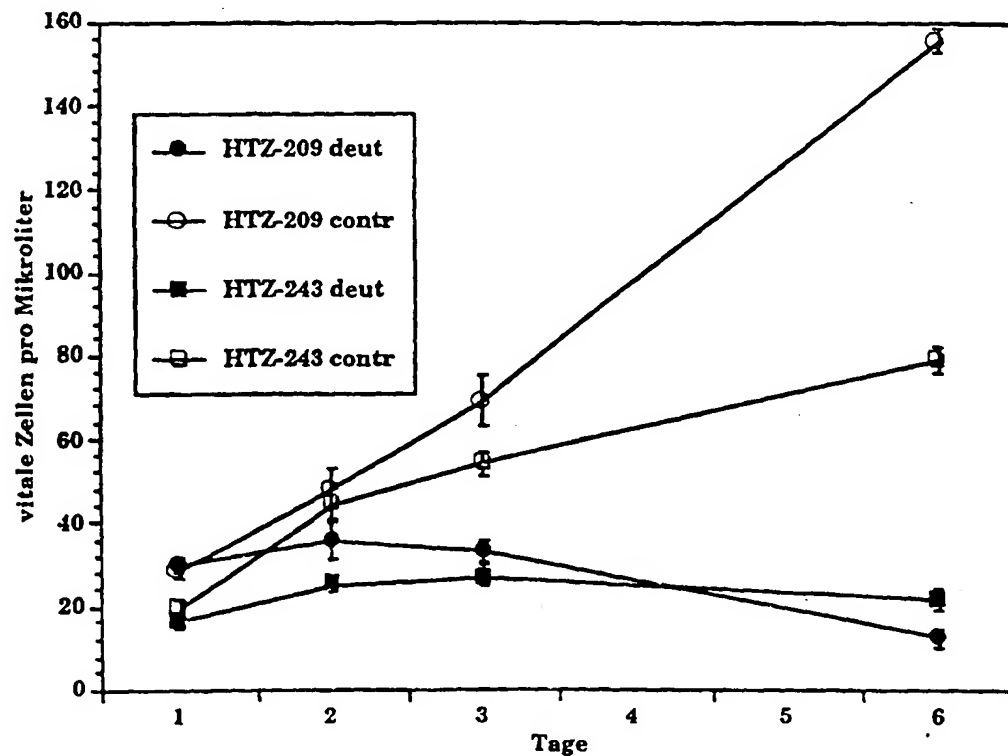


Abb. 24



14/21

Abb. 25

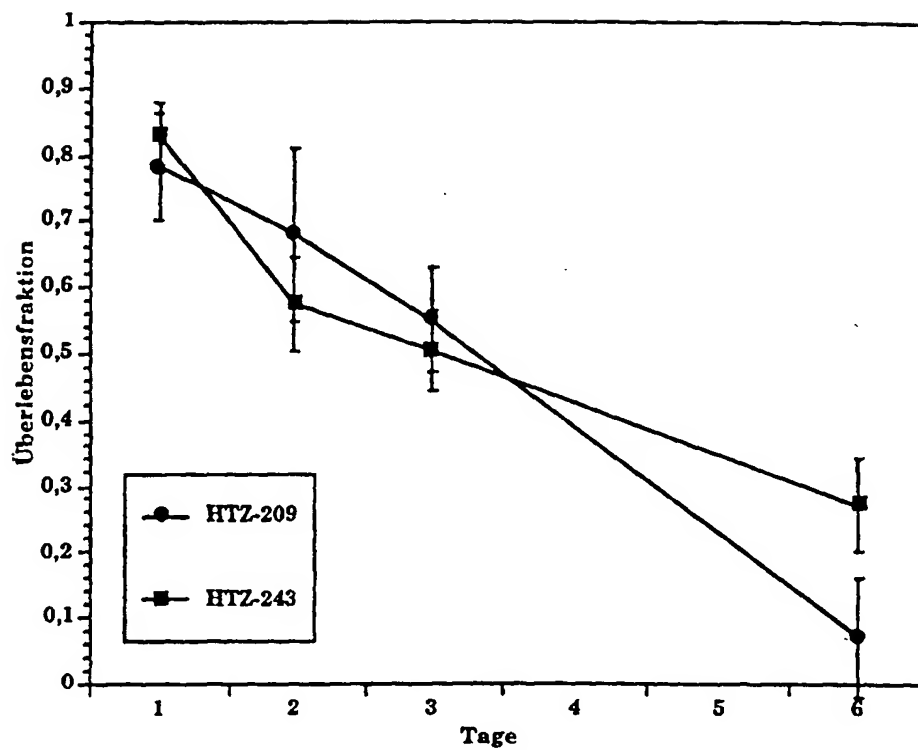
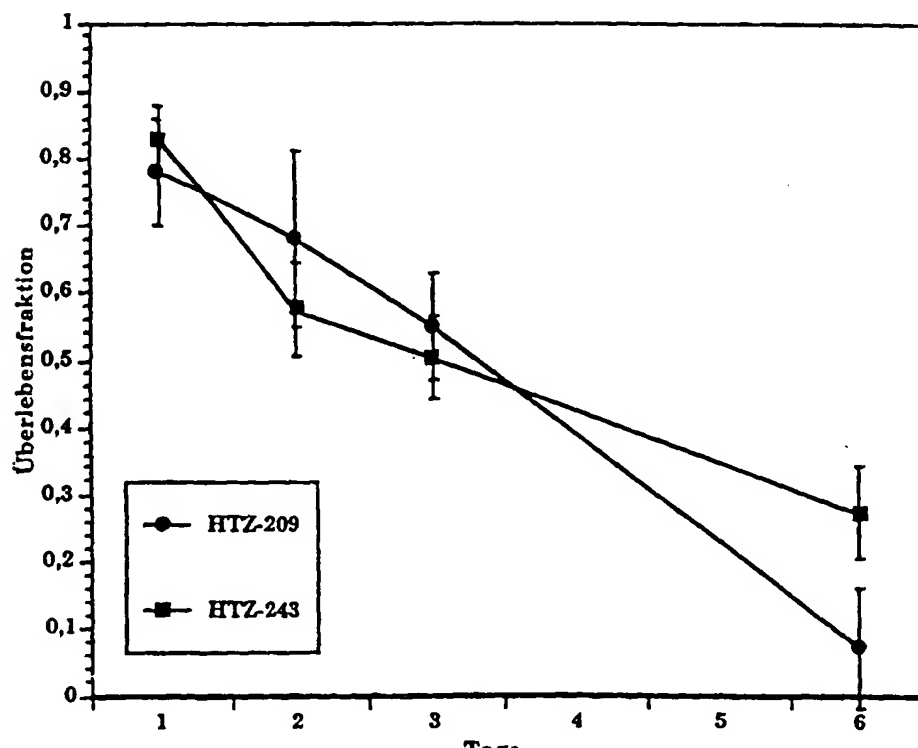
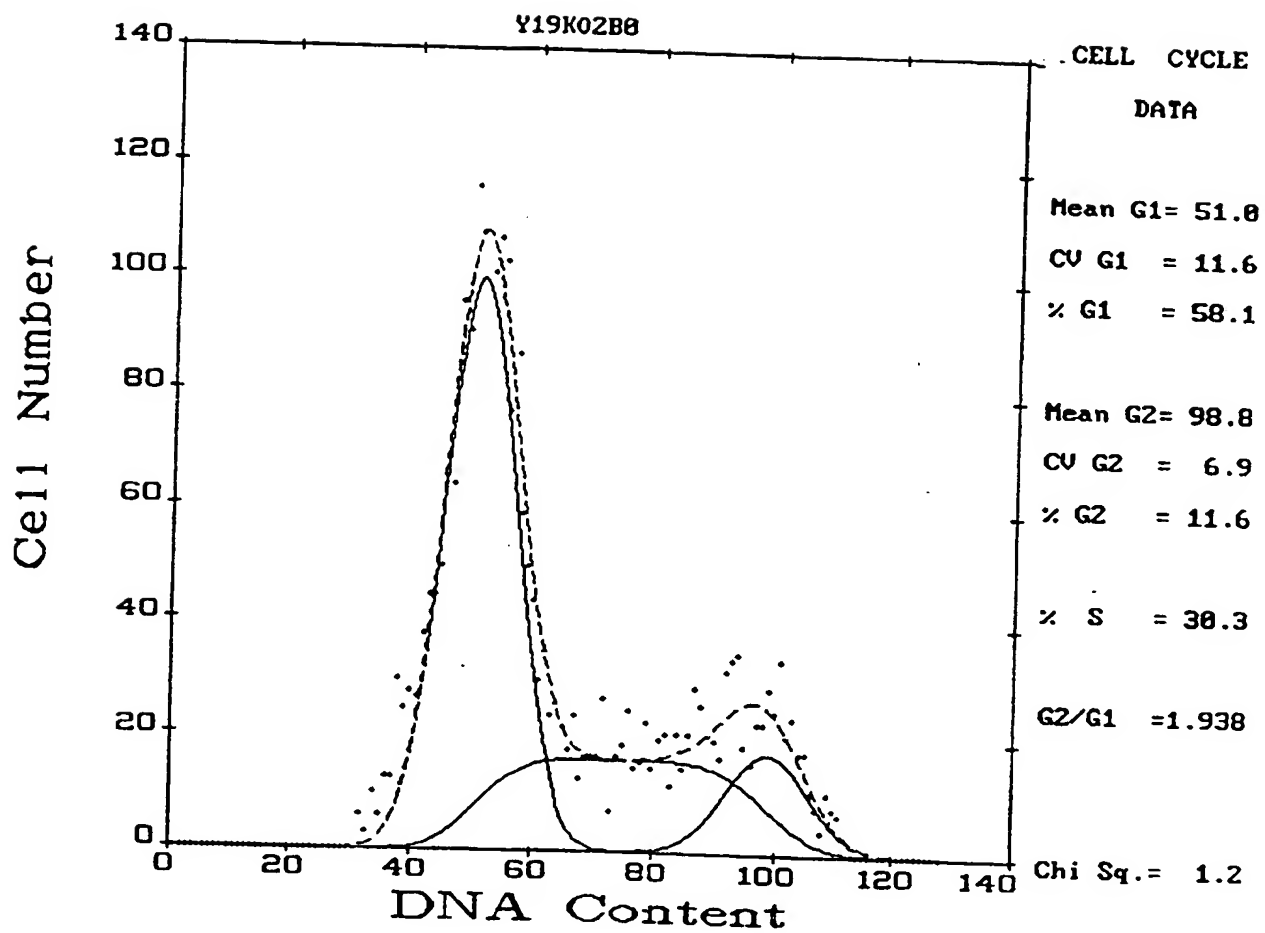


Abb. 26



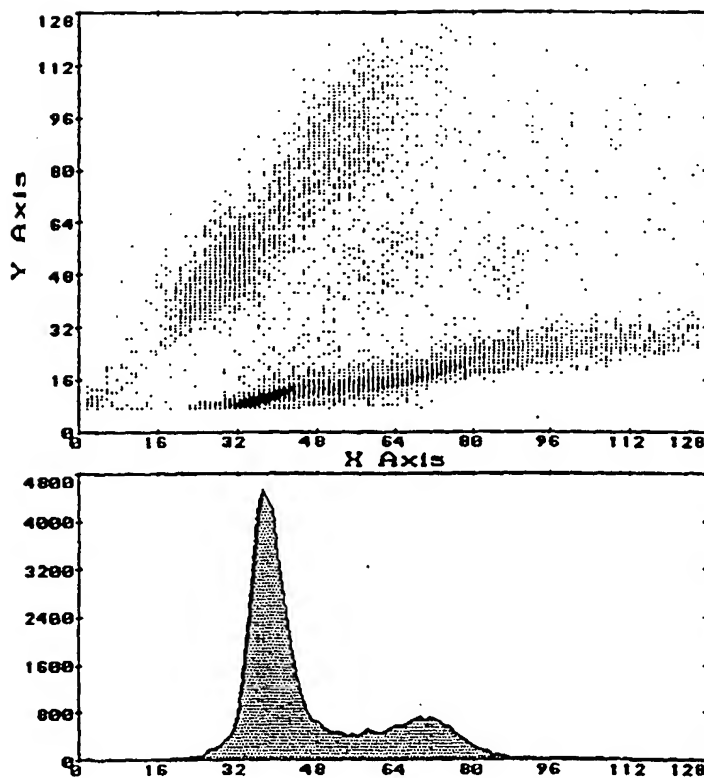
15a/21

Abb. 27a



15b/21

Abb. 27b



PLAT000 10-10-94

19K02B

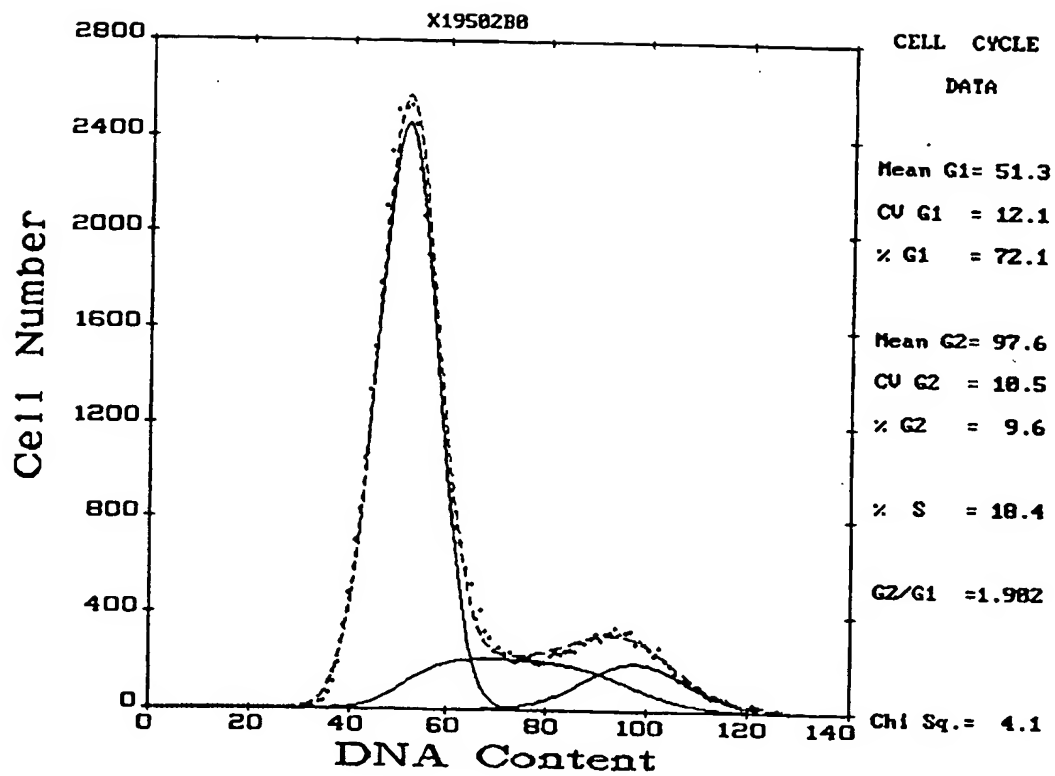
Cells = 59585

% Total = 100.00

Rot Angle = 0

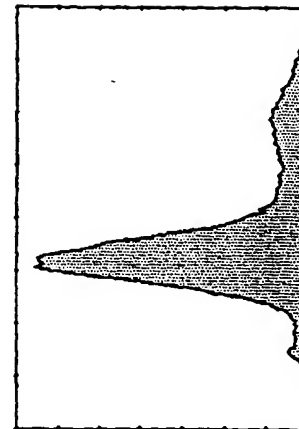
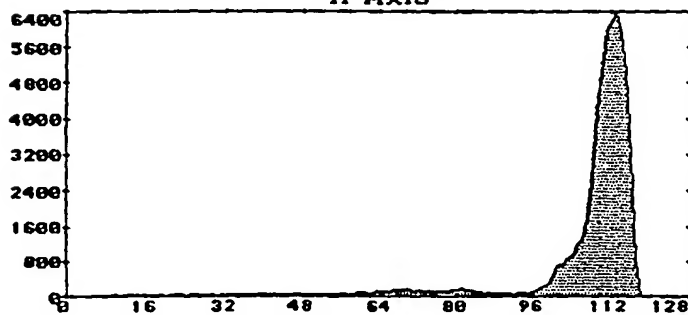
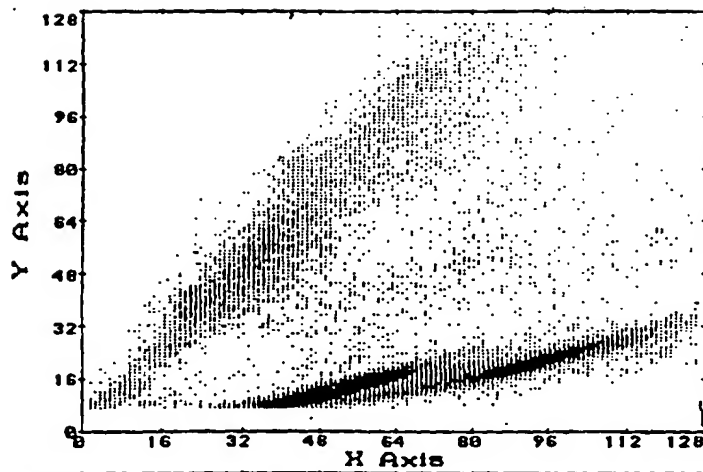
16a/21

Abb. 28a



16b/21

Abb. 28b



PLATTED 0 10-10-94

19582B

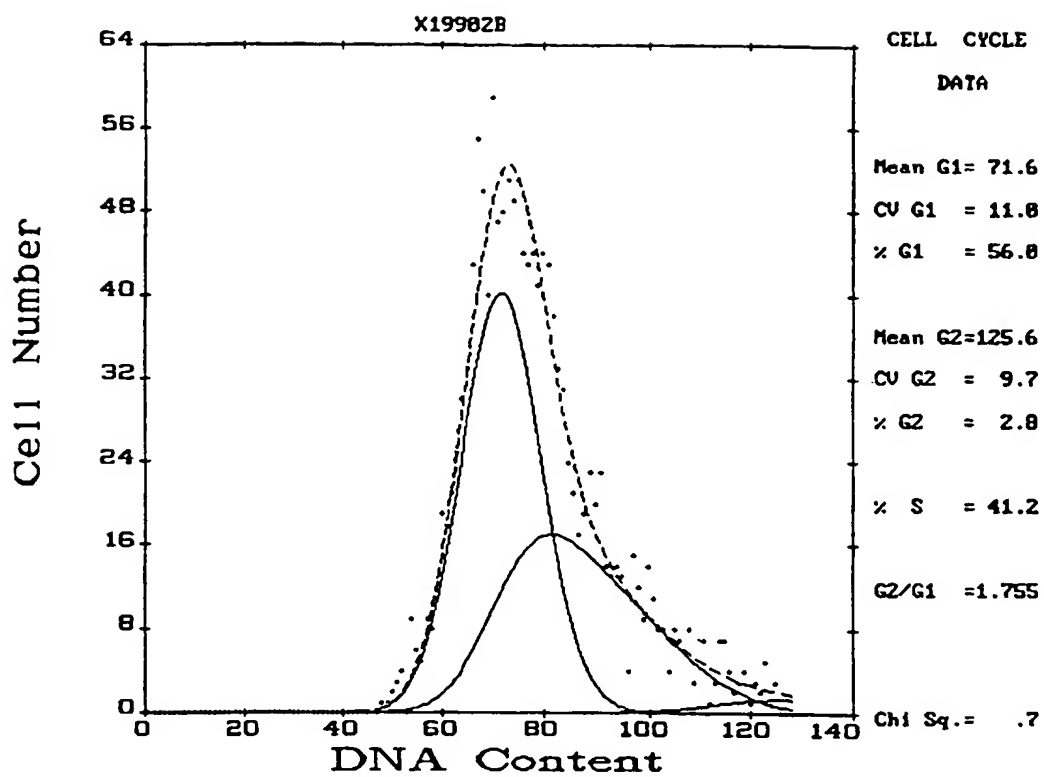
Cells = 59400

% Total = 100.00

Rot Angle = 87

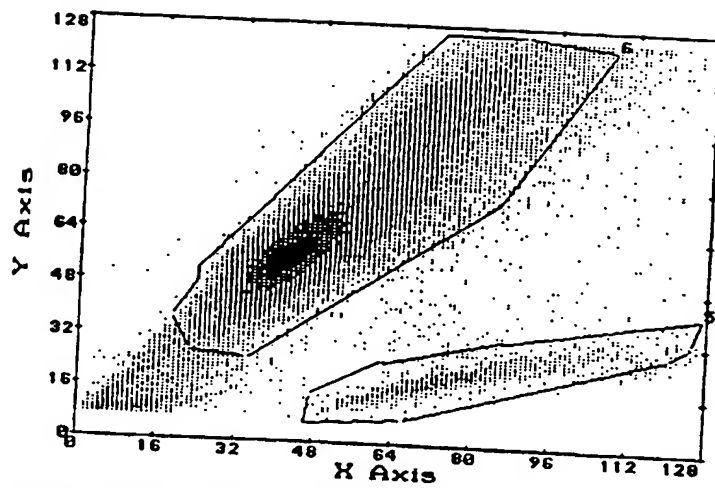
17a/21

Abb. 29a



17b/21

Abb. 29b



19982B

Region	Count	%Tot	PkX	PkY	MeanX	MeanY	MedianX	MedianY	SDX	SDY	Corr
P 5	1437	2.49	78	17	78.5	28.7	76	28	14.8	5.2	.896
P 6	53295	92.28	44	57	52.2	68.8	49	63	15.2	28.8	.918

Abb. 30

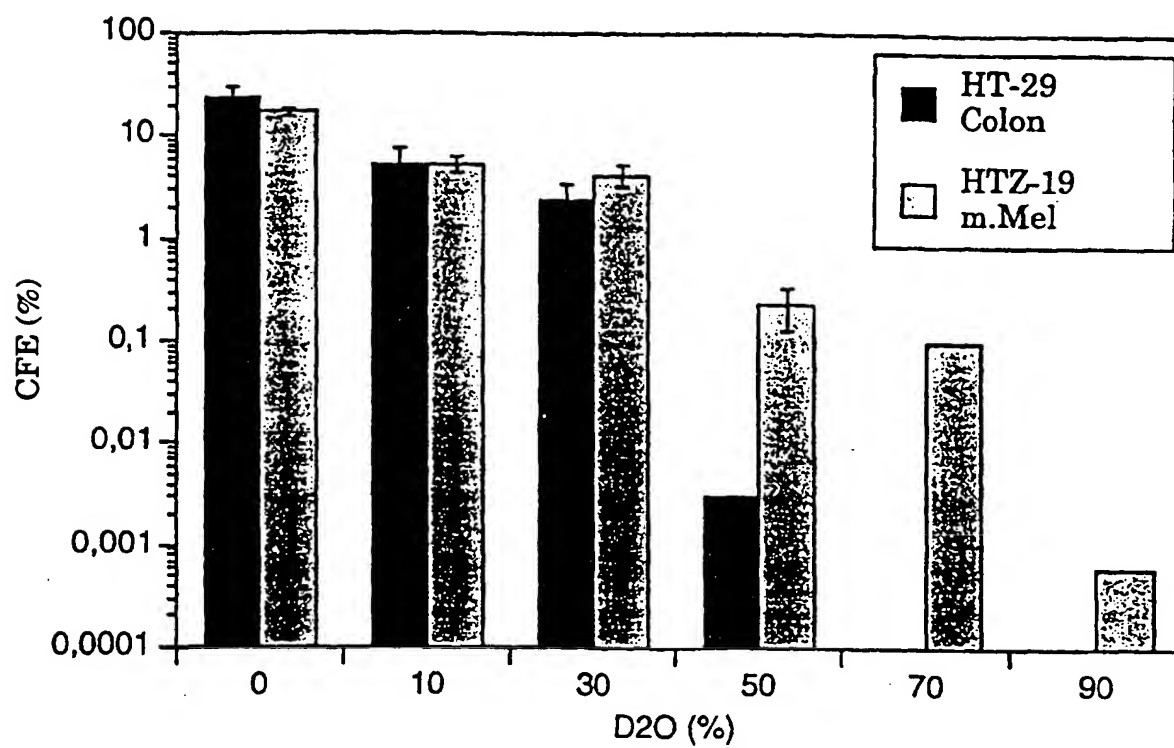


Abb. 31

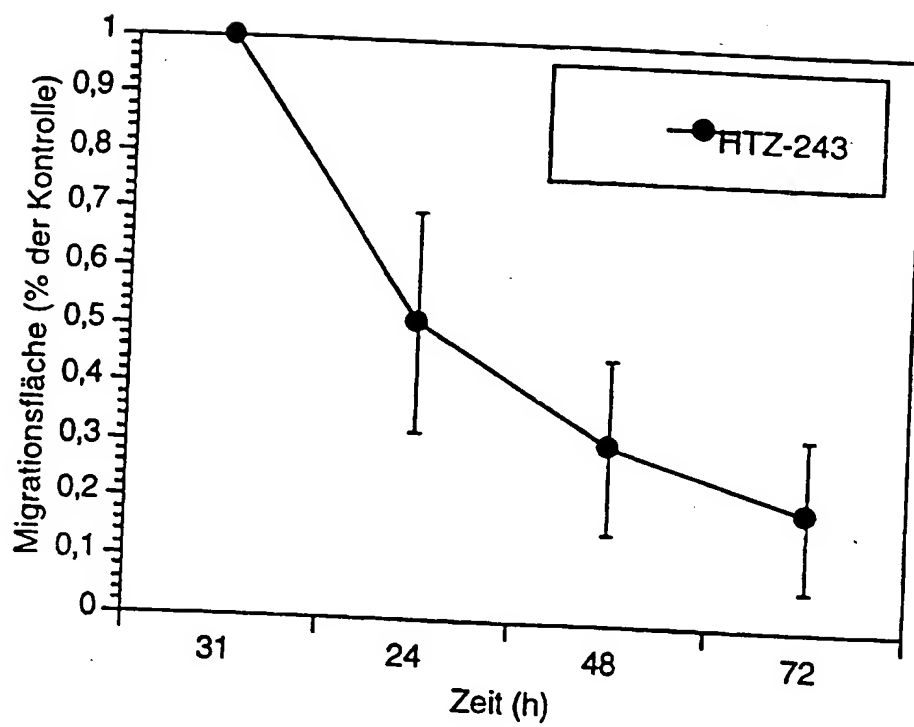


Abb. 32

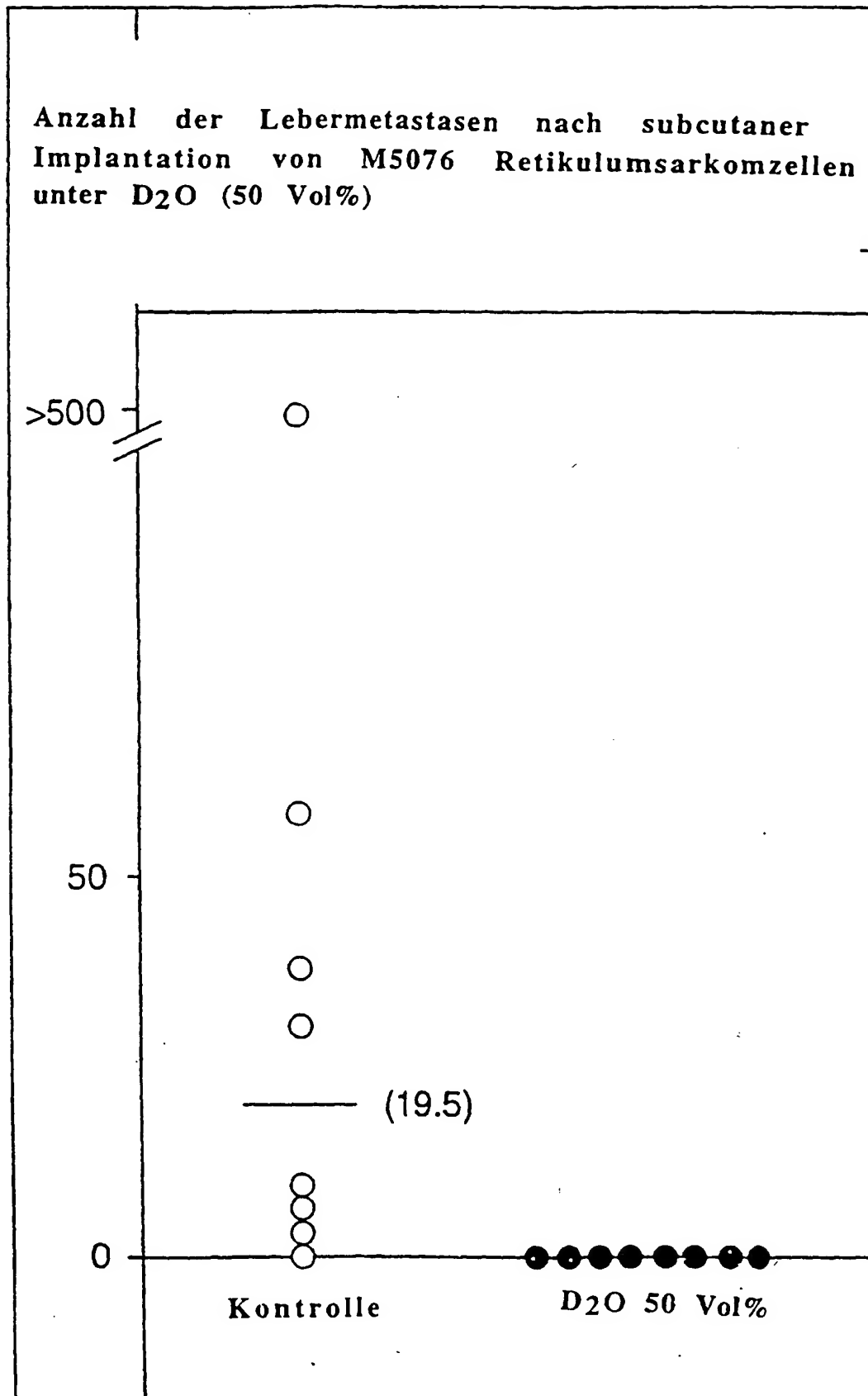


Abb. 33

